

Calcitonin II

¹²⁵I RIA Kit

For the quantitative determination
of human calcitonin in serum

Instruction Manual

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manual de Instrucciones

Manuale di Istruzioni

Bruksanvisning

Catalog No./REF./KAT.-NR./N° de Catálogo/

Numero di Catalogo/Katalognummer: 25065 or 25130

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English	Page 1
Français	11
Deutsch	22
Español	33
Italiano.....	43
Svenska	53

CALCITONIN RADIOIMMUNOASSAY

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

This kit contains instructions and materials for the quantitative determination of human calcitonin in serum by radioimmunoassay (RIA).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Calcitonin is a peptide hormone with a molecular weight of 3,418 and contains thirty two amino acids:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
H-Cys-Gly- Asn-Leu- Ser- Thr- Cys-Met- Leu- Gly- Thr- Tyr- Thr- Gln- Asp-Phe- Asn-
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
Lys- Phe- His- Thr- Phe-Pro- Gln- Thr- Ala- Ile- Gly- Val- Gly- Ala- Pro- NH₂

In humans, this hypocalcemic hormone is secreted by thyroidal parafollicular cells of neuroectodermal origin, probably in response to hypercalcemia.^{10,14} Calcitonin's hypocalcemic actions are mediated via effects on bone and kidney.⁶

DiaSorin has developed and thoroughly tested a sensitive calcitonin radioimmunoassay (RIA) that can detect calcitonin (CT) concentrations as low as 15 pg/mL. The primary use for calcitonin RIA is serological detection of malignant growths. Medullary thyroid cancer (MTC), which comprises 4-8% of thyroid tumors, secretes calcitonin in excess. Very high levels of circulating calcitonin, detected by RIA, are useful in evaluating this type of tumor.^{5,7,11,21} Some of these MTCs are hereditary, and it is important to screen **all** members of a family for calcitonin excess when a case is discovered. Other uses of the calcitonin RIA include investigation of ectopic calcitonin production in cancer patients, particularly those with breast and lung tumors.^{4,9,13,18,24} Very active investigation is taking place to discover the usefulness of calcitonin measurements in the evaluation of nonthyroidal type malignancies.^{8,16,19}

3. PRINCIPLES OF THE ASSAY

The DiaSorin Calcitonin II RIA is a disequilibrium procedure using delayed tracer addition to increase sensitivity. The antibody was produced in a goat against pure synthetic human calcitonin. In this RIA, sample and first antibody are combined and incubated for 16-24 hours at 2-8°C. Tracer is then added, followed by a second incubation for 16-24 hours at 2-8°C. A pre-precipitated second antibody complex is added to separate the bound from free tracer. The assay can then be centrifuged and decanted after 15-20 minutes incubation at 20-25°C.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Calcitonin Calibrator 0	1 vial/10 mL	2 vial/10 mL
Calcitonin Calibrator	2 vials/1.0 mL	4 vials/1.0 mL
Calcitonin Antiserum	1 vial/14 mL	2 vials/14 mL
¹²⁵ I Calcitonin	1 vial/7 mL	2 vials/7 mL
Calcitonin Precipitating Complex	1 vial/35 mL	2 vials/ 35 mL
Calcitonin Controls	2 vials/1.0 mL	4 vials/ 1.0 mL
Number of tests	65	130

STORAGE: Upon receipt, and prior to reconstitution, store all reagents at 2-8°C. After reconstitution store all reagents at -15° or lower until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 Calcitonin Calibrator 0: lyophilized reagent

BSA-borate buffer with sodium azide (0.25%) added. Reconstitute the vial with 10 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.2 Calcitonin II Calibrator: lyophilized reagent

Human synthetic calcitonin, at a nominal concentration of 1,000 pg/mL, is diluted in BSA-borate buffer with sodium azide (0.2%) and other stabilizers added. Exact concentration values are assigned with each lot. Reconstitute the vial with 1.0 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes on crushed ice until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using. In order to obtain the entire calibrator curve, make serial dilutions by adding 500 µL of calibrator to 500 µL of calibrator 0. For example, if the calibrator concentration is 1,000 pg/mL, calibrators of 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 pg/mL will be made as follows:

Add 500 µL of 1,000 pg/mL calibrator to 500 µL of calibrator 0 and mix to give 500 pg/mL.

Add 500 µL of 500 pg/mL calibrator to 500 µL of calibrator 0 and mix to give 250 pg/mL.

Add 500 µL of 250 pg/mL calibrator to 500 µL of calibrator 0 and mix to give 125 pg/mL.

Add 500 µL of 125 pg/mL calibrator to 500 µL of calibrator 0 and mix to give 62.5 pg/mL.

Add 500 µL of 62.5 pg/mL calibrator to 500 µL of calibrator 0 and mix to give 31.25 pg/mL.

CAUTION: Keep tubes on crushed ice while the serial dilutions are being made and prior to use in the assay. The DiaSorin calcitonin calibrator has been analyzed against the World Health Organization calcitonin standard 70/234. The calibrator demonstrates commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

DISCARD ANY EXCESS; DO NOT FREEZE.

4.3 Calcitonin Antiserum: lyophilized reagent

Goat anti-calcitonin serum is diluted in BSA-borate buffer with sodium azide (0.1%) and blue dye added. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.4 ¹²⁵I Calcitonin: lyophilized reagent

Synthetic human calcitonin is labeled with iodine-125 and diluted in BSA-borate-EDTA buffer with sodium azide (0.4%) and red dye added. Reconstitute the vial with 7 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix gently before using.

4.5 Calcitonin Precipitating Complex: lyophilized reagent

Normal goat serum, pre-precipitated with donkey anti-goat serum and polyethylene glycol (PEG), is diluted in BSA-borate buffer with sodium azide (0.1%) added. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water. Mix thoroughly until the suspension appears homogenous and then allow it to stand for a minimum of thirty minutes at room temperature with occasional mixing.

4.6 Calcitonin Controls (Level 1 and 2): lyophilized reagent

Human serum is spiked, if necessary, with the appropriate amount of synthetic human calcitonin to obtain a concentration within a specified range. Sodium azide (0.1%) and other stabilizers are added. Reconstitute the vial with 1.0 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly and treat as an unknown sample. Ranges are printed on the control vials.

CAUTION: DISCARD ANY EXCESS; DO NOT FREEZE.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th ed., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 1.5 μ Ci (55.5 kBq) kit No. 25065 or 3 μ Ci (111 kBq) kit No. 25130 of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the

package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERORATION OF KIT REAGENTS

- 6.1** The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.
- 6.2** A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.3** A decrease in maximum binding.
- 6.4** A high nonspecific binding.

7. COLLECTION AND PREPARATION OF THE SPECIMEN

One hundred microliters, in duplicate, of serum are required for the assay. Collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. Centrifuge for fifteen minutes using 760 x g* to obtain hemolysis-free serum. No additives or preservatives are required to maintain integrity of the sample. All plastics, glassware or other materials coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination. A fasting specimen is recommended but not required. Calcitonin is labile at room temperature. If the serum is not assayed immediately, it should be stored at -15°C or lower. Specimens should not be repeatedly frozen and thawed.

8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- 8.1** Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm. Plastic tubes **cannot** be used.
- 8.2** Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes (20-25°C).
- 8.3** Gamma scintillation counter capable of counting iodine-125.
- 8.4** Vortex.
- 8.5** Pipetting devices:
 - a.** Micropipettors calibrated to deliver 100 µL and 200 µL.
 - b.** Repeating dispensers calibrated to deliver 200 µL and 500 µL.
- 8.6** Purified water

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1** Thaw unknown samples and place on crushed ice.
- 9.2** Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures above 20-25°C. Mix gently and then place on ice before using.
- 9.3** Set up labeled 12 x 75 mm disposable borosilicate glass tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the back page.
- 9.4 Place the rack of tubes on crushed ice.**
- 9.5** Add reagents as follows:
 - a. Total count tubes**
Set aside until step 7
 - b. Nonspecific binding (NSB)**
100 µL of calibrator 0
 - c. Calibrator 0**
100 µL of calibrator 0
200 µL of calcitonin antiserum (blue)
 - d. Calcitonin calibrators**
100 µL of calcitonin calibrator
200 µL of calcitonin antiserum (blue)

e. Quality control and unknown samples

100 µL of serum

200 µL of calcitonin antiserum (blue)

- 9.6** Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 16-24 hours at 2-8°C.
- 9.7** Add 100 µL of ¹²⁵I calcitonin (red) to all tubes.
- 9.8** Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 16-24 hours at 2-8°C.
- 9.9** Vigorously mix the precipitating complex; add 500 µL to all tubes except the total count tubes.
- 9.10** Vortex the tubes gently without foaming and incubate for 15-25 minutes at 20-25°C.
- 9.11** Centrifuge using 760 x g* for twenty minutes at 20-25°C.
- 9.12** Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a maximum of two minutes. Blot the tubes with absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.
- 9.13** Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for a sufficient time to achieve statistical accuracy. (See Limitations of the Procedure section.)

10. PROCEDURAL COMMENTS

- 10.1** Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.
- 10.2** Assay tubes must be set up on crushed ice to avoid spuriously high values.
- 10.3** Some manufacturers' disposable borosilicate glass tubes yield elevated nonspecific bindings. **Do not** use plastic tubes in this assay.
- 10.4** If you choose to aspirate supernatant from precipitate, be careful not to disturb the precipitate.
- 10.5** To completely monitor the consistent performance of an RIA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters to assure consistent kit performance.
- a. Total Counts**
 - b. Maximum Binding**
Average counts per minute (CPM) of calibrator 0 Tubes / Average CPM of Total Count Tubes.
 - c. Nonspecific Binding**
Average CPM of NSB Tubes / Average CPM of Total Count Tubes.
 - d. Slope of Calibrator Curve**
For example, monitor the 80, 50 and 20% suppression points of the calibrator line.

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two control sera in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ± 2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the quality control sera included in this kit.

$$* \quad g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

12. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either a linear or logarithmic scale. Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is % B/B₀ versus log concentration.

12.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control and unknown sample.

12.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.

12.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control or unknown sample by the corrected CPM of the calibrator 0.

$$B/B_0 \% = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of 0 Calibrator} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

12.4 Using 2 cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B₀ for the calcitonin calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).

12.5 Draw a best-fit line through the points.

12.6 Interpolate the levels of calcitonin in the unknown samples from the plot.

12.7 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted appropriately with calibrator 0 and assayed again.

12.8 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.

12.9 Calculate maximum binding by dividing CPM of calibrator 0 by the average total counts obtained in the total count tubes.

TABLE II DiaSorin Calcitonin II RIA Sample Data					
Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent Bound (B/T)	Percent Conc. (B/B ₀)(pg/mL)
Total Count	17,943 18,128	18,036			
NSB	878 824	851		4.7	
Calibrator 0	8,055 8,049	8,052	7,201	39.9	100.0
Calibrators (pg/mL)					
A (35.0)	7,344 7,211	7,278	6,427		89.3
B (70.0)	6,969 6,649	6,809	5,958		82.8
C (140)	5,390 5,476	5,433	4,582		63.7
D (280)	3,628 3,725	3,676	2,826		39.3
E (560)	2,301 2,286	2,293	1,442		20.0
F (1,120)	1,519 1,546	1,532	682		9.5
Unknown Samples					
1	6,087 5,940	6,014	5,162		71.7 115
2	4,796 5,012	4,904	4,053		56.3 163

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE II and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

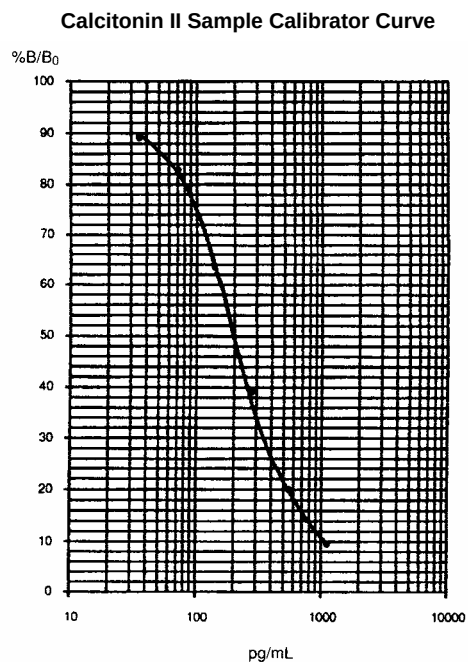


FIGURE 1

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 13.1** If the initial concentration of any unknown sample is greater than the highest calibrator, dilute with calibrator 0 only.
- 13.2** Counting times should be sufficient to prevent statistical error (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).
- 13.3** The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

14. EXPECTED VALUES

Normal Range

Each laboratory should establish its own normal range. Normal values observed in the DiaSorin Laboratory were 47 (± 24 pg/mL). This would lead to a normal range (2 std. dev.) of nondetectable (ND)-95. Smoking may cause slightly elevated serum calcitonin levels.

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Precision

Average Within Assay Variation

	Mean Value (pg/mL)	S.D	%C.V.
Low	67.3	10.1	14.8
Medium	278.5	18.9	6.7
High	530	30.7	5.7

Between Assay Variation

	Mean Value (pg/mL)	S.D	%C.V.
Low	92.76	13.42	14.47
Medium	142.55	16.55	11.61
High	528.79	36.7	6.95

15.2 TRUENESS: THE TRUENESS OF THE ASSAY HAS BEEN VERIFIED BY THE LINEARITY TEST AND THE RECOVERY TEST.

Linearity (Parallelism)

Serial Dilution Study of four Unknown Samples

Sample Number	Undiluted (pg/mL)	1/2	1/4	1/8
1	534	624.5	663.7	696.1
2	277.2	291.8	346.5	289.4
3	975.6	1216.9	1396.8	1487.6
4	819.3	1047.9	1144.2	1081

Recovery

Five unknown samples have been diluted 1:1 with calibrators 0, 48, 96, 193, 385, 770 and 1,540 pg/mL. Each dilution was then assayed and an overall mean recovery % was calculated for every unknown sample used.

Sample Number	Overall Mean Recovery (%)
1	105
2	83
3	77
4	85
5	85

15.3 Analytical Sensitivity

When defined as the apparent concentration at three standard deviations from the counts at maximum binding, the minimum detectable amount is 1.5 pg/tube (15 pg/mL).

15.4 Analytical Specificity

Comparison of the cross-reactivity of calcitonin antibody was made with the following peptides:

Peptide	% Cross-reactivity
Parathyroid Hormone	< 0.01
Insulin	< 0.01
Thyroid Stimulating Hormone	< 0.01
Adrenocorticotrophic Hormone	< 0.01
Prolactin	< 0.01

Salmon calcitonin does not cross-react with the antisera. Rat calcitonin does cross-react and the assay can be used for studies on rats.

15.5 Interference

Interference studies were performed using NCCLS EP7-A as a guideline, to assess the effects of common endogenous interferents. Values obtained from demonstrated interference due to the addition of Triglyceride and hemoglobin. The addition of cholesterol and Bilirubin did not effect results.

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Do not allow reagents to reach above 25°C. Mix gently then place on crushed ice before using.
2. Identify tubes in duplicate. Place the rack of tubes on crushed ice.
3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
Calibrator 0	-	100 µl	100 µL	-
Calibrators (1-6)	-	-	100 µL	-
Extracted Controls	-	-	-	100 µL
Extracted Unknown	-	-	-	100 µL
Samples	-	-	200 µL	200 µL
Antiserum				

4. Cover the tubes with Parafilm and vortex gently.
5. Incubate for 16–24 hours at 2–8°C.
6. Dispense 100 µL of Tracer into all wells.
7. Cover and vortex gently.
8. Incubate for 16–24 hours at 2–8°C.
9. Dispense 500 µL of precipitating complex into all wells except the Total Count tubes.
10. Incubate for 15–25 minutes at 20–25°C.
11. Centrifuge using 760 x g* for 20 minutes.
12. Decant the supernatants.
13. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DE LA CALCITONINE

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Cette trousse contient les instructions et les réactifs permettant d'effectuer la détermination quantitative, par dosage radio-immunologique (RIA), de la calcitonine humaine dans le sérum.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

La calcitonine est une hormone peptidique avec un poids moléculaire de 3 418 et qui contient trente-deux acides-aminés :

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
H-Cys-	Gly-	Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Cys-Met-	Leu-	Gly-	Thr-	Tyr-	Thr-	Gln-	Asp-	Phe-	Asn-	
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Lys-	Phe-	His-	Thr-	Phe-Pro-	Gln-	Thr-	Ala-	Ile-	Gly-	Val-	Gly-	Ala-	Pro-	NH ₂		

Chez l'homme, cette hormone hypocalcémique est sécrétée par les cellules parafolliculaires de la thyroïde d'origine neuroectodermique, probablement en réponse à l'hypercalcémie.^{10,14} Les actions hypocalcémiques de la calcitonine se font par l'intermédiaire des effets sur les os et les reins.⁶

DiaSorin a développé un dosage radio-immunologique (RIA) sensible de la calcitonine et effectué les tests complets avant de valider ce dosage qui permet de détecter des concentrations de calcitonine (CT) aussi faibles que 15 pg/ml. La première utilisation de ce dosage RIA de la calcitonine est la détection sérologique des grossseurs malignes. Le cancer médullaire thyroïdien (MTC), qui compte 4-8% des tumeurs thyroïdiennes, sécrète un excès de calcitonine. Des taux très élevés de calcitonine dans le sang, détectés par le dosage RIA, permettent d'évaluer ce type de tumeur.^{5,7,11,21} Certains cancers médullaires thyroïdiens sont héréditaires et il est important de tester **tous** les membres d'une famille pour dépister un excès de calcitonine quand un cas est découvert. Le dosage RIA de la calcitonine est aussi utilisé pour l'investigation de la production ectopique de calcitonine chez les cancéreux, en particulier les cancers du sein et des poumons.^{4,9,13,18,24} Des investigations très actives ont lieu afin de découvrir l'utilité des mesures de calcitonine dans l'évaluation des tumeurs malignes non thyroïdiennes.^{8,16,19}

3. PRINCIPES DU DOSAGE

Le dosage DiaSorin Calcitonin II RIA est une procédure à l'état de déséquilibre qui utilise l'ajout retardé d'un traceur pour augmenter la sensibilité. L'anticorps est produit chez une chèvre par rapport à la calcitonine humaine synthétique pure. Dans ce dosage RIA, l'échantillon et le premier anticorps sont combinés et incubés pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8°C. Le traceur est alors ajouté, suivi par une seconde incubation pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8°C. Un second complexe d'anticorps pré-précipité est ajouté pour séparer le traceur lié du traceur non lié. Le dosage peut alors être centrifugé et décanté après 15 à 20 minutes d'incubation entre 20 et 25°C.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Étalon 0 calcitonine	1 tube/10 ml	2 tubes/10 ml
Étalon calcitonine	2 tubes/1,0 ml	4 tubes/1,0 ml
Antisérums calcitonine	1 tube/14 ml	2 tubes/14 ml
¹²⁵ I calcitonine	1 tube/7 ml	2 tubes/7 ml
Complexe précipitant calcitonine	1 tube/35 ml	2 tubes/35 ml
Contrôles calcitonine	2 tubes/1,0 ml	4 tubes/1,0 ml
Nombre de dosages	65	130

CONSERVATION : Dès réception, et avant reconstitution, tous les réactifs doivent être stockés entre 2 et 8°C. Après reconstitution, stocker tous les réactifs à une température inférieure ou égale à -15° C jusqu'à la date de péremption sur l'étiquette. Les réactifs ne

doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Étalon 0 calcitonine : réactif lyophilisé

Tampon BSA-borate contenant de l'azide de sodium (0,25%). Reconstituer le tube avec 10 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer entre 15 et 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.2 Étalon calcitonine II : réactif lyophilisé

De la calcitonine synthétique humaine à une concentration nominale de 1 000 pg/ml est diluée dans un tampon BSA-borate contenant de l'azide de sodium (0,2%) et d'autres stabilisants. Les valeurs exactes de ces concentrations sont fournies avec chaque lot. Reconstituer le flacon avec 1,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes sur de la glace pilée jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation. Afin d'obtenir la courbe d'étalonnage complète, effectuer des dilutions en série en ajoutant 500 µl d'étalon à 500 µl d'étalon 0. Par exemple, si la concentration de l'étalon est de 1 000 pg/ml, les étalons ayant les concentrations de 500, 250, 125, 62,5 et 31,25 pg/ml seront obtenus de la façon suivante :

Ajouter 500 µl d'étalon à 1 000 pg/ml à 500 µl d'étalon 0 et mélanger pour obtenir 500 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 500 pg/ml à 500 µl d'étalon 0 et mélanger pour obtenir 250 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 250 pg/ml à 500 µl d'étalon 0 et mélanger pour obtenir 125 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 125 pg/ml à 500 µl d'étalon 0 et mélanger pour obtenir 62,5 pg/ml.

Ajouter 500 µl d'étalon à 62,5 pg/ml à 500 µl d'étalon 0 et mélanger pour obtenir 31,25 pg/ml.

PRÉCAUTION : Maintenir les tubes sur de la glace pilée lors de la préparation des dilutions en série et avant de les utiliser pour le dosage. Les étalons calcitonine DiaSorin ont été analysés selon le standard de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) 70/234. L'étalon démontre sa commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'il est utilisé avec les réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé.

ÉLIMINER TOUS LES SURPLUS DE RÉACTIF ; NE PAS CONGELER.

4.3 Antisérum calcitonine : réactif lyophilisé

Le sérum de chèvre anticalcitonine est dilué dans un tampon BSA-borate contenant de l'azide de sodium (0,1%) et un colorant bleu. Reconstituer chaque tube avec 14 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer entre 15 et 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.4 ¹²⁵I Calcitonine : réactif lyophilisé

De la calcitonine humaine synthétique est marquée à l'iode 125 et diluée dans un tampon BSA-borate-EDTA qui contient de l'azide de sodium (0,4%) et un colorant rouge. Reconstituer le tube avec 7 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; mélanger délicatement avant utilisation.

4.5 Complexe précipitant calcitonine : réactif lyophilisé

Du sérum de chèvre normal, pré-précipité avec du sérum anti-chèvre d'âne et du polyéthylène glycol (PEG), est dilué dans un tampon BSA-borate contenant de l'azide de sodium (0,1%). Reconstituer le tube avec 35 ml d'eau purifiée. Bien mélanger jusqu'à ce que la suspension apparaisse homogène puis laisser reposer pendant 30 minutes minimum à température ambiante en mélangeant de temps en temps.

4.6 Contrôles calcitonine (niveaux 1 et 2) : réactif lyophilisé

Le sérum humain est dopé, si besoin est, avec la quantité adéquate de calcitonine humaine synthétique afin d'obtenir une concentration comprise dans l'intervalle spécifié. On ajoute de l'azide de sodium (0,1%) et d'autres stabilisants. Reconstituer le tube avec 1,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger et traiter comme un échantillon inconnu. Les intervalles figurent sur les étiquettes des tubes de contrôle.

PRÉCAUTION: ÉLIMINER LES SURPLUS DE RÉACTIF ; NE PAS CONGELER.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode U.S. agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAg, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (VHB), du virus de l'hépatite C (VHC), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document des Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4^{ème} éd., Mai 1999 ou dernière édition.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 1,5 µCi (55,5 kBq) pour la trousse No. 25065 ou 3 µCi (111 kBq) pour la trousse No. 25130 d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire *in vitro* n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear

Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radiologique. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du tube du traceur. Les étiquettes de la boîte et du tube du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

- 6.1 Présence de particules anormales dans l'un des réactifs.
- 6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.
- 6.3 Diminution de la liaison maximale.
- 6.4 Haute liaison non spécifique.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Cent microlitres de sérum, en doublet, sont nécessaires pour le dosage.

Prélever du sang par ponction veineuse dans un tube en verre à vide de 5 ou 10 ml. Centrifuger pendant quinze minutes à $760 \times g^*$ pour obtenir du sérum non hémolysé. Aucun additif ou conservateur n'est requis pour maintenir l'intégrité de l'échantillon. Tous les plastiques, articles en verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés. Un échantillon à jeun est recommandé, mais pas obligatoire.

La calcitonine est labile à température ambiante. Si le sérum n'est pas dosé immédiatement, il doit être conservé à une température inférieure ou égale à -15°C . Ne pas congeler un échantillon qui a été décongelé.

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- 8.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm. **Ne pas** utiliser les tubes en plastique.
- 8.2 Centrifugeuse à thermostat ($20-25^{\circ}\text{C}$) pour tubes 12 x 75 mm tubes.
- 8.3 Compteur à scintillation gamma pouvant mesurer l'iode 125.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Pipettes :
 - a. Micropipettes graduées pour distribuer 100 μl et 200 μl .
 - b. Distributeurs à répétition gradués pour distribuer 200 μl et 500 μl .
- 8.6 Eau purifiée

$$* \quad g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^{2*}$$

9. PROCÉDURE DE DOSAGE

- 9.1 Décongeler les échantillons inconnus et mettre sur de la glace pilée.
- 9.2 Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux réactifs congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 20-25° C. Mélanger délicatement puis placer sur de la glace avant utilisation.
- 9.3 Installer des tubes en verre jetables de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le Profil de dosage de la dernière page.
- 9.4 Mettre le portoir sur de la glace pilée.
- 9.5 Ajouter les réactifs comme suit :
 - a. **Tubes de numération totale**
Laisser de côté jusqu'à l'étape 7
 - b. **Liaison non spécifique (NSB)**
100 µl d'étalon 0
 - c. **Étalon 0**
100 µl d'étalon 0
200 µl d'antisérum calcitonine (bleu)
 - d. **Étalons calcitonine**
100 µl d'étalon calcitonine
200 µl d'antisérum calcitonine (bleu)
 - e. **Contrôle qualité et échantillons inconnus**
100 µl de sérum
200 µl d'antisérum calcitonine (bleu)
- 9.6 Mélanger les tubes délicatement à l'aide du Vortex en évitant la formation de mousse et incubé pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8° C.
- 9.7 Ajouter 100 µl de ¹²⁵I calcitonine (rouge) dans tous les tubes.
- 9.8 Mélanger les tubes délicatement à l'aide du Vortex en évitant la formation de mousse et incubé pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8° C.
- 9.9 Mélanger vigoureusement le complexe précipitant ; ajouter 500 µl dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale.
- 9.10 Mélanger doucement à l'aide du vortex sans former de mousse et incubé pendant 15 à 25 minutes entre 20 et 25 °C.
- 9.11 Centrifuger les tubes pendant vingt minutes à 760 x g* entre 20 et 25° C.
- 9.12 Décanter immédiatement le surnageant de tous les tubes, à l'exception des tubes de numération totale, en les renversant pendant deux minutes au maximum. Placer les tubes sur du papier absorbant pour éliminer toutes les gouttes de surnageant qui peuvent rester sur les bords avant de les replacer à l'endroit.
- 9.13 A l'aide du compteur à scintillation gamma, compter le précipité de chaque tube et des tubes de numération totale pendant le temps nécessaire à l'obtention d'une exactitude statistique suffisante (consulter le paragraphe Limitations de la Procédure).

10. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

- 10.1 Ajouter chaque aliquote de réactif au tiers inférieur du tube à essai pour garantir le mélange complet des réactifs.
- 10.2 Mettre les tubes à essai sur de la glace pilée pour éviter l'obtention de valeurs faussement élevées.
- 10.3 Certains fabricants vendent des tubes jetables qui donnent des liaisons non spécifiques élevées. **Ne pas** utiliser de tubes en plastique pour ce dosage.

$$*g = (1\,118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

10.4 Si le surnageant est aspiré dans le précipité, prendre soin de ne pas remuer le précipité.

10.5 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère de vérifier les paramètres suivants afin d'assurer la constance des performances de la trousse.

a. Numérations totales

b. Liaison maximale

Numérations moyennes par minute (CPM) des tubes de l'étalon 0/CPM moyenne des tubes de numération totale.

c. Liaison non spécifique

CPM moyenne des tubes NSB/CPM moyenne des tubes de numération totale.

d. Pente de la courbe d'étalonnage

Par exemple, surveiller les points d'inhibition de 80, 50 et 20 % de la courbe d'étalonnage.

11. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux sérums de contrôle dans chaque dosage pour garantir la validité de leurs résultats. Déterminer ensuite la moyenne et l'écart-type pour chaque contrôle, sur un minimum de dix dosages. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces contrôles en utilisant l'écart-type ± 2 par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le laboratoire de contrôle qualité de DiaSorin a déterminé un intervalle de valeurs pour les sérums de contrôle de qualité de la trousse.

12. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux "adaptés" à une méthode particulière que d'autres. La méthode de calcul pour le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B₀ par rapport à la concentration logarithmique.

12.1 Calculer la CPM moyenne pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.

12.2 Soustraire la CPM moyenne des tubes NSB de toutes les numérations.

12.3 Diviser la CPM corrigée de chaque étalon, contrôle ou échantillon inconnu par la CPM corrigée de l'étalon 0.

$$B/B_0 \% = \frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

12.4 En utilisant du papier logarithmique ou semi-logarithmique à 2 cycles, tracer le pourcentage B/B₀ pour les étalons calcitonine (axe vertical) par rapport à la concentration (axe horizontal).

12.5 Tracer la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.

12.6 Interpoler les taux de calcitonine dans les échantillons inconnus d'après le tracé.

12.7 Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé de nouveau.

12.8 Si un échantillon inconnu a été dilué, corriger en fonction du facteur de dilution approprié.

12.9 Calculer la liaison maximale en divisant la CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

TABLEAU II Données d'échantillon RIA Calcitonine II Diasorin					
Tube	CPM en double	CPM moyenne	CPM corrigée de liaison	Pourcent. (B/T)	Pourcent Conc. (B/B ₀) (pg/ml)
Numération totale	17 943 18 128	18 036			
NSB	878 824	851		4,7	
Étalon 0	8 055 8 049	8 052	7 201	39,9	100,0
Étalons (pg/ml)					
A (35,0)	7 344 7 211	7 278	6 427		89,3
B (70,0)	6 969 6 649	6 809	5 958		82,8
C (140)	5 390 5 476	5 433	4 582		63,7
D (280)	3 628 3 725	3 676	2 826		39,3
E (560)	2 301 2 286	2 293	1 442		20,0
F (1 120)	1 519 1 546	1 532	682		9,5
Échantillons à déterminer					
1	6 087 5 940	6 014	5 162		71,7 115
2	4 796 5 012	4 904	4 053		56,3 163

Des données d'échantillon typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU II et à la FIGURE 1 ; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

Courbe d'étalonnage pour les échantillons de calcitonine II

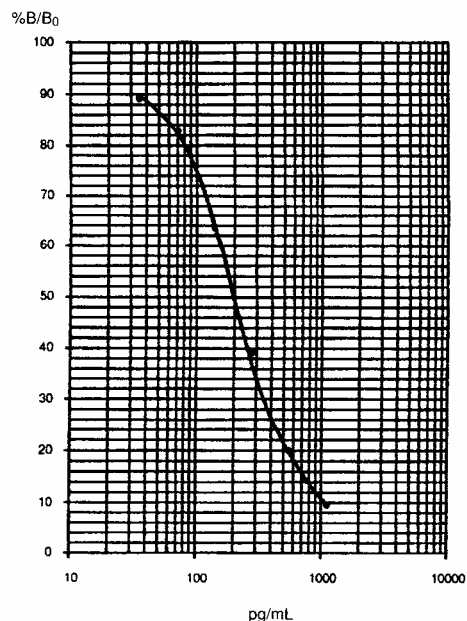


FIGURE 1

13. LIMITES DU DOSAGE

- 13.1** Si la concentration initiale d'un échantillon à déterminer est supérieure à la valeur de l'étalon le plus haut, le diluer avec l'étalon 0 uniquement.
- 13.2** Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5% ; 10 000 CPM donneront une erreur de 1%).
- 13.3** Le laboratoire CQ DiaSorin utilise un programme d'ajustement de courbe cubique ("smoothed spline curve fit").

14. VALEURS ATTENDUES

Valeurs normales

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. Le laboratoire DiaSorin a obtenu un intervalle des valeurs normales de 47(±24 pg/ml). Ce qui donnerait un intervalle de référence (2 écarts-types) de non détectable (ND)-95. Les fumeurs peuvent avoir des taux de calcitonine sérique légèrement plus élevés.

15. CRITERES DE QUALITE

15.1 Précision

Variation intra-dosage moyenne

	Valeur moyenne (pg/ml)	Ecart-type	% C.V.
Bas	67,3	10,1	14,8
Moyen	278,5	18,9	6,7
Élevé	530	30,7	5,7

Variation entre les dosages

	Valeur moyenne (pg/ml)	Ecart-type	% C.V.
Bas	92,76	13,42	14,47
Moyen	142,55	16,55	11,61
Élevé	528,79	36,7	6,95

15.2 EXACTITUDE : L'EXACTITUDE DU DOSAGE A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR LES TESTS DE LINÉARITÉ ET DE RÉCUPÉRATION.

Linéarité (parallélisme)

Étude de dilution en série de quatre échantillons inconnus

Numéro d'échantillon	Non dilué (pg/ml)	1/2	1/4	1/8
1	534	624,5	663,7	696,1
2	277,2	291,8	346,5	289,4
3	975,6	1216,9	1396,8	1487,6
4	819,3	1047,9	1144,2	1081

Récupération

Cinq échantillons inconnus ont été dilués au 1:1 avec des étalons 0, 48, 96, 193, 385, 770 et 1,540 pg/ml. Chaque dilution a été dosée et une récupération globale moyenne (%) a été calculée pour chaque échantillon inconnu utilisé.

Numéro d'échantillon	Récupération globale moyenne (%)
1	105
2	83
3	77
4	85
5	85

15.3 Sensibilité analytique

Définie comme la concentration obtenue à trois écarts-types de l'activité de liaison maximale, la quantité minimale décelable est de 1,5 pg/tube (15 pg/ml).

15.4 Spécificité analytique

La comparaison de la réactivité croisée de l'anticorps anticalcitonine a été effectuée avec les peptides suivants :

Peptide	% réaction croisée
Hormone parathyroïdienne	< 0,01
Insuline	< 0,01
Hormone de stimulation de la thyroïde	< 0,01
Hormone adrénocorticotrope	< 0,01
Prolactine	< 0,01

Il n'y a pas de réaction croisée de la calcitonine de saumon vis-à-vis des antisérums. Il y a une réaction croisée de la calcitonine de rat et le dosage peut être utilisé pour des études chez le rat.

15.5 Interférence

Des études d'interférence ont été effectuées en utilisant la directive NCCLS EP7-A, afin d'évaluer les effets des substances interférantes endogènes courantes. Les valeurs sont obtenues avec les interférences observées suite à l'addition de Triglycéride et d'hémoglobine. L'addition de cholestérol et bilirubine est sans effet.

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR LES RÉFÉRENCES

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C. Mélanger délicatement puis mettre sur de la glace pilée avant utilisation.
2. Identifier les tubes en double. Mettre le portoir de tubes sur de la glace pilée.
3. Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

Tubes/Réactifs	Numérations totales	NSB	Étalon 0-5	Contrôles et échantillons inconnus
Étalon 0	-	100 µl	100 µl	-
Étalons (1-6)	-	-	100 µl	-
Contrôles extraits	-	-	-	100 µl
Échantillons inconnus extraits	-	-	-	100 µl
Antisérum	-	-	200 µl	200 µl

4. Couvrir les tubes avec du parafilm et agiter délicatement à l'aide du vortex.
5. Incuber pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8°C.
6. Distribuer 100 µl de traceur dans tous les puits.
7. Couvrir et mélanger doucement à l'aide du vortex.
8. Incuber pendant 16 à 24 heures entre 2 et 8°C.
9. Distribuer 500 µl de complexe précipitant dans les puits à l'exception des tubes de numération totale.
10. Incuber pendant 15 à 25 minutes entre 20 et 25°C.
11. Centrifuger à 760 x g* pendant 20 minutes.
12. Décanner les surnageants.
13. Compter chaque tube dans un compteur gamma pendant 60 secondes ou plus.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

CALCITONIN RADIOIMMUNOASSAY

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Dieses Kit enthält Anleitungen und Material für die quantitative Bestimmung von humanem Calcitonin in Serum mit dem Radioimmunoassay (RIA).

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Calcitonin ist ein Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von 3418 Dalton und enthält 32 Aminosäuren.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
H-Cys-	Gly-	Asn-Leu-	Ser-Thr-	Cys-Met-	Leu-Gly-	Thr-Tyr-	Thr-Gln-	Asp-Phe-	Asn-							
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Lys-Phe-	His-Thr-	Phe-Pro-	Gln-Thr-	Ala-Ile-	Gly-Val-	Gly-Ala-	Pro-NH ₂									

Bei Menschen wird dieses hypokalzämische Hormon in den parafollikulären Zellen neuroektodermalen Ursprungs der Schilddrüse sekretiert, wahrscheinlich als Reaktion auf Hyperkalzämie.^{10,14} Die Wirkung auf Knochen und Nieren steuert die hypokalzämische Wirkung von Calcitonin.⁶

DiaSorin hat einen empfindlichen Radioimmunoassay (RIA) entwickelt und ausgiebig getestet, mit dem kleinste Calcitonin-Konzentrationen (CT) ab 15 pg/ml bestimmt werden können. Der Einsatzschwerpunkt für den Calcitonin-RIA liegt in der serologischen Bestimmung von malignen Geschwulsten. Ein medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC), das zu 4–8 % aus Schilddrüsentumoren besteht, bildet Calcitonin im Überfluss. Sehr hohe Calcitonin-Spiegel, die mit einem RIA erkannt werden, helfen bei der Evaluierung eines solchen Tumors.^{5,7,11,21} Einige dieser MTC sind erblich. Daher ist es wichtig, **alle** Familienmitglieder auf übermäßige Calcitonin-Produktion zu testen, wenn ein Fall in der Familie auftritt. Ein anderes Einsatzgebiet des RIA ist u. a. die Ermittlung der ektopischen Calcitonin-Produktion bei Krebspatienten, v. a. bei Patienten mit Brust- und Lungentumoren.^{4,9,13,18,24} Der Nutzen von Calcitonin-Messungen für die Evaluierung von malignen Tumoren, die ihren Ursprung nicht in der Schilddrüse haben, wird intensiv untersucht.^{8,16,19}

3. TESTPRINZIPIEN

Bei dem Calcitonin II RIA von DiaSorin handelt es sich um ein Dysäquilibriumverfahren, das verzögerte Tracerzugaben nutzt, um die Empfindlichkeit zu erhöhen. Statt reines synthetisches Human calcitonin zu verwenden, wurde der Antikörper durch Immunisierung einer Ziege hergestellt. In diesen Assay werden die Probe und der erste Antikörper miteinander kombiniert und 16 bis 24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubiert. Anschließend wird ein Tracer hinzugegeben, gefolgt von einer zweiten Inkubation für 16 bis 24 Stunden bei 2–8 °C. Der präzipitierende zweite Antikörperkomplex wird hinzugefügt, um den gebundenen vom ungebundenen Tracer zu trennen. Der Test kann nach 15 bis 20 Minuten Inkubation bei 20–25 °C zentrifugiert und dekantiert werden.

4. REAGENZIEN DES KITS

Calcitonin-Nullkalibrator	1 Fläschchen/10 ml	2 Fläschchen/10 ml
Calcitonin-Kalibrator	2 Fläschchen/1 ml	4 Fläschchen/1 ml
Calcitonin-Antiserum	1 Fläschchen/14 ml	2 Fläschchen/14 ml
¹²⁵ I Calcitonin	1 Fläschchen/7 ml	2 Fläschchen/7 ml
Calcitonin, Präzipitierender	1 Fläschchen/35 ml	2 Fläschchen/35 ml
Komplex	2 Fläschchen/1 ml	4 Fläschchen/1 ml
Calcitonin-Kontrollen		
Anzahl der Tests	65	130

LAGERUNG: Nach Empfang und vor der Rekonstitution alle Reagenzien bei 2–8 °C aufbewahren. Nach der Rekonstitution sind dagegen alle Reagenzien bis zum Verfallsdatum bei höchstens –15° zu lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angegeben und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 Calcitonin-Nullkalibrator: Lyophilisiertes Reagenz

BSA-Boratpuffer mit Natriumazid (0,25 %). Jedes Fläschchen mit 10 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.2 Calcitonin II Kalibrator: Lyophilisiertes Reagenz

Humanes synthetisches Calcitonin wird mit einer nominalen Konzentration von 1000 pg/ml in einem BSA-Boratpuffer mit Natriumazid (0,1 %) und anderen Stabilisatoren verdünnt. Jede Charge hat genaue Konzentrationswerte. Das Fläschchen mit 1,0 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15 bis 20 Minuten lang auf Crash-Eis stehen lassen, bis sich der Inhalt vollständig gelöst hat. Vor dem Gebrauch gründlich mischen. Um die vollständige Kalibratorkurve zu erhalten, Serienverdünnungen vornehmen, indem 500 µl des Kalibrators zu 500 µl des Nullkalibrators zugegeben werden. Beispiel: Wenn die Kalibratorkonzentration 1000 pg/ml beträgt, werden Kalibratoren von 500, 250, 125, 62,5 und 31,25 pg/ml wie folgt zusammen gesetzt:

500 µL von 1000 pg/ml Kalibrator zu 500 µL des Nullkalibrators geben und mischen, um eine Lösung von 500 pg/ml zu erhalten.

500 µL von 500 pg/ml Kalibrator zu 500 µL des Nullkalibrators geben und mischen, um eine Lösung von 250 pg/ml zu erhalten.

500 µL von 250 pg/ml Kalibrator zu 500 µL des Nullkalibrators geben und mischen, um eine Lösung von 125 pg/ml zu erhalten.

500 µL von 125 pg/ml Kalibrator zu 500 µL des Nullkalibrators geben und mischen, um eine Lösung von 62,5 pg/ml zu erhalten.

500 µL von 62,5 pg/ml Kalibrator zu 500 µL des Nullkalibrators geben und mischen, um eine Lösung von 31,25 pg/ml zu erhalten.

ACHTUNG: Die Röhrchen während der Serienverdünnungen und vor der Verwendung mit dem Test auf Crash-Eis belassen. Der Calcitonin-Kalibrator von DiaSorin wurde entsprechend dem Calcitonin-Standard 70/234 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) analysiert. Die Kalibratoren des Kits sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *in-vitro*-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

ÜBERSCHÜSSIGES MATERIAL ENTSORGEN; NICHT EINFRIEREN.

4.3 Calcitonin Antiserum: Lyophilisiertes Reagenz

Ziege-Anticalcitonin-Serum mit BSA-Boratpuffer verdünnen, der Natriumazid (0,1 %) enthält und blauen Farbstoff zugeben. Das Fläschchen mit 14 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15–20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.4 ¹²⁵I Calcitonin: Lyophilisiertes Reagenz

Synthetisches humanes Calcitonin mit Jod-125 markieren und in einem BSA-Borat-EDTA-Puffer mit Natriumazid (0,4 %) und zugesetztem roten Farbstoff verdünnen. Das Fläschchen mit 7 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und bis zur vollständigen Lösung des Inhalts 15 bis 20 Minuten stehen lassen; Vor Gebrauch vorsichtig schütteln.

4.5 Calcitonin, Präzipitierender Komplex: Lyophilisiertes Reagenz

Normales Ziegen Serum, vor-präzipitiert mit Esel-Anti-Ziegen Serum und Polyethylenglykol (PEG), in einem BSA-Boratpuffer mit hinzugefügtem Natriumazid (0,1 %) verdünnen. Das Fläschchen mit 35 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Gründlich mischen, bis die Suspension homogen erscheint, dann mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen und hin und wieder schütteln.

4.6 Calcitonin-Kontrollen (Ebene 1 und 2): Lyophilisiertes Reagenz

Bei Bedarf Humanserum mit der entsprechenden Menge an humanem Calcitonin versetzen, um eine Konzentration innerhalb des Sollbereichs zu erzielen. Natriumazid (0,1 %) und andere Stabilisatoren hinzufügen. Das Fläschchen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15 bis 20 Minuten lang bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen. Gründlich mischen und als unbekannte Probe behandeln. Die Bereiche sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt.

ACHTUNG: ÜBERSCHÜSSIGES MATERIAL ENTSORGEN; NICHT EINFRIEREN.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN ENTHALTEN MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenziell infektiös zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 4. Aufl., Mai 1999 oder aktuelle Auflage, als potenziell infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

ACHTUNG: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das ggf. mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Bei der Entsorgung mit viel Wasser spülen, um eine Azidbildung zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" des Handbuchs "Safety Management" Nr. CDC-22, herausgegeben vom Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 1976.

Europäische Gemeinschaft: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

R 20/21/22 – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R 32 – Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 – Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser spülen.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit maximal 1,5 µCi (55,5 kBq) Jod-125 – Kit-Nr. 25065 bzw. 3 µCi (111 kBq) Jod-125 – Kit-Nr. 25130. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen das Material oder dessen Strahlung weder Menschen noch Tieren intern oder extern verabreicht wird. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von dem auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen Wert geringfügig abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während auf dem Beipackzettel die theoretische Radioaktivität angegeben ist.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIEN

- 6.1 Ungewöhnliche Partikel in einem der Reagenzien
- 6.2 Eine Verschiebung der Steigung oder Position der Kalibratorkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen.
- 6.3 Eine Abnahme der maximalen Bindung
- 6.4 Eine hohe nichtspezifische Bindung

7. GEWINNUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Für den Test werden 100 µl Serum im Duplikat benötigt.

Das Vollblut durch Venenpunktion in einem evakuierten Glasröhrchen für 5 ml oder 10 ml sammeln. Die Blutproben 15 Minuten bei $760 \times G^*$ zentrifugieren, um hämolysefreies Serum zu gewinnen. Zur Aufrechterhaltung der Probenreinheit sind weder Zusatzstoffe noch Konservierungsmittel erforderlich. Alle Kunststoffteile, Glasteile und sonstige Materialien, die Kontakt mit den Proben haben, müssen frei von jeglichen Verunreinigungen sein. Eine Nüchternprobe wird empfohlen, ist jedoch nicht erforderlich.

Calcitonin ist bei Zimmertemperatur labil. Wenn das Serum nicht unverzüglich getestet wird, sollte es bei höchstens -15°C gelagert werden. Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 8.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12×75 mm Kunststoffröhrchen dürfen **nicht** verwendet werden.
- 8.2 Zentrifuge mit Temperaturregelung (20°C bis 25°C) für Röhrchen 12×75 mm.
- 8.3 Gammazintillationszähler zur Zählung von Jod-125
- 8.4 Schüttelgerät
- 8.5 Pipettiergeräte:
 - a. Mikropipetten, kalibriert auf die Abgabe von 100 µl und 200 µl.
 - b. Multipipetten, kalibriert auf die Abgabe von 200 µl und 500 µl.
- 8.6 Destilliertes Wasser

$$* G = (1118 \times 10^{-6}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

9. TESTVERFAHREN

- 9.1 Unbekannte Proben auftauen und auf Crash-Eis belassen.
- 9.2 Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Reagenzien vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen maximal auf 20–25 °C erwärmt werden. Vorsichtig mischen und vor dem Gebrauch auf Eis lagern.
- 9.3 Markierte Einweg-Glasröhrchen 12 × 75 mm in doppelter Ausführung aufstellen (siehe Testplan auf der letzten Seite).
- 9.4 **Den Röhrchenständer auf Crash-Eis aufbewahren.**
- 9.5 Reagenzien wie folgt zugeben:
 - a. **Röhrchen für die Gesamtzählung**
Bis Schritt 7 beiseite legen.
 - b. **Nichtspezifische Bindung (NSB)**
100 µl des Nullkalibrators
 - c. **Nullkalibrator**
100 µl des Nullkalibrators
200 µL des Calcitonin-Antiserums (blau)
 - d. **Calcitonin-Kalibrator**
100 µL des Calcitonin-Kalibrators
200 µL des Calcitonin-Antiserums (blau)
 - e. **Qualitätskontrolle und unbekannte Proben**
100 µL des Serums
200 µL des Calcitonin-Antiserums (blau)
- 9.6 Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung schütteln und 16–24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubieren.
- 9.7 Allen Röhrchen 100 µl Jod¹²⁵ (rot) zusetzen.
- 9.8 Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung schütteln und 16 bis 24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubieren.
- 9.9 Den präzipitierende Komplex gründlich mischen; 500 µl zu allen Röhrchen außer den Röhrchen für die Gesamtzählung zugeben.
- 9.10 Die Röhrchen vorsichtig ohne Schaumbildung schütteln und 15 bis 25 Minuten bei 20–25 °C inkubieren.
- 9.11 Mit 760 × G* 20 Minuten lang bei 20–25 °C zentrifugieren.
- 9.12 Die Überstände bei allen Röhrchen außer bei den Gesamtzählröhrchen sofort dekantieren und maximal zwei Minuten umdrehen. Bevor die Röhrchen aufrecht gestellt werden, die Röhrchen auf Saugpapier abtupfen, um alle eventuellen Tropfen von Überständen auf den Rändern zu entfernen.
- 9.13 Mit einem Gammazintillationszähler den Niederschlag in jedem Röhrchen und den Röhrchen für die Gesamtzählung eine Minute lang auszählen. (Siehe Abschnitt Grenzen des Verfahrens).

10. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

- 10.1 Jedes Aliquot des Reagenz in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.
- 10.2 Die Teströhrchen auf Crash-Eis lagern, um falsche Werte zu vermeiden.
- 10.3 Die Einwegröhrchen einiger Hersteller können nichtspezifische Bindungen ergeben. Bei diesem Test **keine** Kunststoffröhrchen verwenden.
- 10.4 Falls Sie es vorziehen, den Überstand vom Präzipitat abzusaugen, dabei das Präzipitat nicht aufrühren.

* $G = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (\text{U/min})^2$

10.5 Um die konsistente Leistung eines Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, müssen möglicherweise weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um eine konsistente Leistung des Kits sicherzustellen.

a. Gesamtzählung

b. Maximale Bindung

Durchschnittliche Impulse pro Minute (CPM) des Nullkalibratorröhrchens/
Durchschnittliche CPM der Gesamtzählröhrchen.

c. Nichtspezifische Bindung

Durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen/Durchschnittliche CPM der
Gesamtzählröhrchen.

d. Steigung der Kalibratorkurve

Z. B. Überwachung der Suppressions-Punkte 80 %, 50 % und 20 % der
Kalibratorkurve.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte mindestens zwei Kontrollproben in jedem Test vorsehen, um die Gültigkeit der jeweiligen Ergebnisse zu prüfen. Ein Mittelwert und eine Standardabweichung sind dann für jede Kontrolle in mindestens zehn Versuchsgängen zu bestimmen. Ein zulässiger Wertebereich kann dann für diese Kontrollen mit ± 2 Standardabweichungen der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätssicherungslabor von DiaSorin hat für die in diesem Kit enthaltenen Kontrollen einen bestimmten Bereich festgelegt.

12. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Kalibratorkurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibrations-Kalibratoren aufgetragen werden. Die Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala haben. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Tests ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin Qualitätskontrolllabor ist % B/B₀ gegen log Konzentration.

12.1 Die durchschnittlichen CPM für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe berechnen.

12.2 Die durchschnittlichen CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.

12.3 Die korrigierten CPM jedes Kalibrators, jeder Kontrolle oder unbekannten Probe durch die korrigierten CPM des Nullkalibrators dividieren.

$$B/B_0 \% = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekannten Probe} - \text{CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators} - \text{CPM der NSB}} \times 100$$

12.4 Auf halblogarithmischem oder doppeltlogarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B₀ für die Calcitonin-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Konzentration (horizontale Achse) auftragen.

12.5 Durch die Punkte eine Ausgleichsline ziehen.

12.6 Die Calcitonin-Spiegel der unbekannten Proben aus der grafischen Darstellung interpolieren.

12.7 Wenn die Werte einer unbekannten Probe größer sind als die größten Kalibratorwerte, ist die unbekannte Probe entsprechend mit Nullkalibrator zu verdünnen und neu zu testen.

12.8 Wenn eine unbekannte Probe verdünnt wurde, den Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigieren.

12.9 Zur Berechnung der maximalen Bindung die CPM des Nullkalibrators durch die in den Gesamtzählröhrchen erhaltenen gesamten gezählten Impulse dividieren.

TABELLE II DiaSorin Calcitonin II RIA Probandaten					
Röhrchen	Doppelte CPM	Durchschnittl. CPM	Korr. CPM	Prozent Gebunden (B/T)	Prozent Konz. (B/B ₀) (pg/ml)
Gesamte gezählte Impulse	17.943 18.128	18.036			
NSB	878 824	851		4,7	
Kalibrator 0	8.055 8.049	8.052	7.201	39,9	100,0
Kalibratoren (pg/ml)					
A (35,0)	7.344 7.211	7.278	6.427		89,3
B (70,0)	6.969 6.649	6.809	5.958		82,8
C (140)	5.390 5.476	5.433	4.582		63,7
D (280)	3.628 3.725	3.676	2.826		39,3
E (560)	2.301 2.286	2.293	1.442		20,0
F (1.120)	1.519 1.546	1.532	682		9,5
Unbekannte Proben					
1	6.087 5.940	6.014	5.162		71,7 115
2	4.796 5.012	4.904	4.053		56,3 163

Typische Probandaten und eine Kalibratorokurve sind in TABELLE II und ABBILDUNG 1 dargestellt; diese Informationen dienen nur als Referenz und dürfen nicht zur Berechnung von Werten verwendet werden.

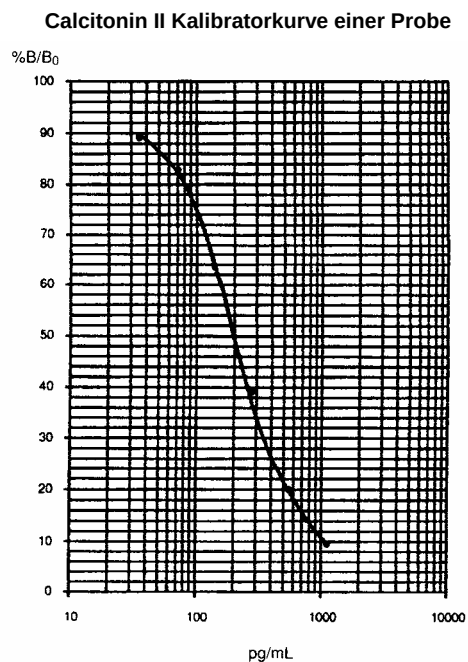


ABBILDUNG 1

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

- 13.1** Wenn die ursprüngliche Konzentration einer unbekannten Probe größer ist als der größte Kalibratorwert, diese Probe nur mit dem Nullkalibrator verdünnen.
- 13.2** Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um statistische Fehler zu vermeiden (2.000 CPM ergeben z. B. 5 % Fehler; 10.000 CPM ergeben 1 % Fehler).
- 13.3** Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

14. ERWARTETE WERTE

Normalbereich

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich ermitteln. Die im Labor von DiaSorin eingehaltenen Normalwerte lagen bei 47 ± 24 pg/ml. Dies führt zu einem Normalbereich (2 Standardabweichungen) von nicht bestimmbar bis 95. Bei Rauchern können die Calcitonin-Spiegel im Serum leicht erhöht sein.

15. SPEZIELLE LEISTUNGSMERKMALE

15.1 Wiederholgenauigkeit

Inter-Assay-Variation

	Mittelwert (pg/ml)	SA	% VK
Niedrig	67,3	10,1	14,8
Mittel	278,5	18,9	6,7
Hoch	530	30,7	5,7

Intra-Assay-Variation

	Mittelwert (pg/ml)	SA	% VK
Niedrig	92,76	13,42	14,47
Mittel	142,55	16,55	11,61
Hoch	528,79	36,7	6,95

15.2 RICHTIGKEIT: DIE RICHTIGKEIT DES TESTS WURDE DURCH LINEARITÄTSTEST UND WIEDERFINDUNGSTEST BESTÄTIGT.

Linearität (Parallelität)

Ergebnisse der Serienverdünnung von vier unbekannten Serumproben

Probennummer	Unverdünnt (pg/ml)	1/2	1/4	1/8
1	534	624,5	663,7	696,1
2	277,2	291,8	346,5	289,4
3	975,6	1216,9	1396,8	1487,6
4	819,3	1047,9	1144,2	1081

Wiederfindung

Fünf unbekannte Proben wurden 1:1 mit Kalibratoren 0, 48, 96, 193, 385 und 770 sowie 1540 pg/ml verdünnt. Jede Verdünnung wurde anschließend getestet und ein Gesamtmittel der Wiederfindung in Prozent für jede verwendete unbekannte Probe berechnet.

Probennummer	Gesamtmittel d. Wiederfindung (%)
1	105
2	83
3	77
4	85
5	85

15.3 Analytische Sensitivität

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die scheinbare Konzentration bei 3 Standardabweichungen von den Zählungen bei maximaler Bindung definiert wird, beträgt sie 1,5 pg/Röhrchen (15 pg/ml).

15.4 Analytische Spezifität

Der Vergleich der Kreuzreaktivität des Calcitonin-Antikörpers wurde mit dem folgenden Peptiden durchgeführt:

Peptid	% Kreuzreaktivität
Parathormon	< 0,01
Insulin	< 0,01
Thyreotropin	< 0,01
Corticotropin	< 0,01
Prolaktin	< 0,01

Lachscaltonin weist keine Kreuzreaktivität mit den Antisera auf. Rattencalcitonin weisen keine Kreuzreaktivität auf, so dass dieser Test für Studien an Ratten verwendet werden kann.

15.5 Störungen

Entsprechend der Richtlinie NCCLS EP7-A wurden Studien durchgeführt, um die Auswirkungen von allgemeinen endogenen Störsubstanzen zu untersuchen. Die gewonnen Werte waren auf die Zugabe von Triglycerid und Hämoglobin zurückzuführen. Die Zugabe von Cholesterin und Bilirubin haben die Ergebnisse nicht beeinflusst.

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25 °C erwärmt werden. Die Reagenzien vorsichtig mischen und vor dem Gebrauch auf Crash-Eis lagern.
2. Röhrchen in doppelter Anordnung aufstellen. Den Röhrchenständer auf Crash-Eis lagern.
3. Reagenzien wie folgt dispensieren:

Röhrchen/ Reagenzien	Totalaktivität	NSB	Kal 0-5	Kontrollen und unbekannte Proben
Nullkalibrator	-	100 µl	100 µl	-
Kalibratoren (1-6)	-	-	100 µl	-
Extrahierte Kontrollen	-	-	-	100 µl
Extrahierte	-	-	-	100 µl
unbekannte Proben	-	-	200 µl	200 µl
Antiserum				

4. Die Röhrchen mit Parafilm abdecken und vorsichtig schütteln.
5. 16 bis 24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubieren.
6. 100 µl Tracer in alle Wells dispensieren.
7. Abdecken und vorsichtig schütteln.
8. 16 bis 24 Stunden lang bei 2–8 °C inkubieren.
9. 500 µL des präzipitierenden Komplexes in alle Röhrchen außer den Röhrchen für die Gesamtzählung dispensieren.
10. 15 bis 25 Minuten lang bei 20–25 °C inkubieren.
11. 20 Minuten lang mit 760 x G* zentrifugieren.
12. Die Überstände dekantieren.
13. Jedes Röhrchen mindestens 60 Sekunden lang in einem Gammazintillationszähler zählen.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{u/min})^2$$

RADIOINMUNOENSAYO DE CALCITONINA

1. INDICACIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

Este equipo contiene instrucciones y materiales para la determinación cuantitativa de calcitonina humana en suero mediante radioinmunoensayo (RIA).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La calcitonina es una hormona peptídica con un peso molecular de 3.418 que contiene treinta y dos aminoácidos:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
H-Cys-	Gly-	Asn-	Leu-	Ser-	Thr-	Cys-	Met-	Leu-	Gly-	Thr-	Tyr-	Thr-	Gln-	Asp-	Phe-	Asn-
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Lys-	Phe-	His-	Thr-	Phe-	Pro-	Gln-	Thr-	Ala-	Ile-	Gly-	Val-	Gly-	Ala-	Pro-	NH ₂	

En los seres humanos, esta hormona hipocalcémica se secreta en las células parafoliculares tiroideas de origen neuroectodérmico, probablemente como reacción a la hipercalcemia.^{10,14} La acción hipocalcémica de la calcitonina se advierte por sus efectos en huesos y riñones.⁶

DiaSorin ha desarrollado y comprobado exhaustivamente un radioinmunoensayo (RIA) sensible a la calcitonina (CT) capaz de detectar concentraciones muy reducidas, como 15 pg/mL. El principal uso del RIA de calcitonina es la detección de crecimiento maligno en suero. El cáncer medular de tiroides (CMT), que comprende el 4-8% de los tumores tiroideos, secreta calcitonina en exceso. Para evaluar este tipo de tumor es muy útil detectar, como hace el RIA, niveles muy elevados de calcitonina circulante.^{5,7,11,21} Algunos de estos CMT son hereditarios, por lo que, cuando se descubre un caso, es importante examinar a **todos** los miembros de la familia por si presentaran un exceso de calcitonina. El RIA de calcitonina también se emplea para investigar la producción ectópica de calcitonina en pacientes con cáncer, especialmente los afectados de tumores de mama y pulmón.^{4,9,13,18,24} Se está investigando intensamente si la medición de calcitonina es útil para evaluar malignidades de tipo no tiroideo.^{8,16,19}

3. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El RIA para calcitonina II de DiaSorin es un procedimiento de desequilibrio con adición de trazador retardada para aumentar la sensibilidad. Se ha obtenido un anticuerpo anticalcitonina humana sintética en una cabra. En este RIA, la muestra y el primer anticuerpo se combinan e incuban durante 16-24 horas a 2-8° C. Después se agrega trazador, seguido de una segunda incubación durante 16-24 horas a 2-8° C. Se agrega un segundo complejo de anticuerpo pre-precipitado para separar el trazador unido del libre. A continuación el ensayo puede centrifugarse y decantarse tras 15-20 minutos de incubación a 20-25° C.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibrador 0 de calcitonina	1 vial/10 mL	2 viales/10 mL
Calibrador de calcitonina	2 viales/1 mL	4 viales/1 mL
Antisuero de calcitonina	1 vial/14 mL	2 viales/14 mL
Calcitonina ¹²⁵ I	1 vial/7 mL	2 viales/7 mL
Complejo de precipitación de calcitonina	1 vial/35 mL	2 viales/35 mL
Controles de calcitonina	2 viales/1 mL	4 viales/1 mL
Número de pruebas	65	130

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción y antes de su reconstitución, deben almacenarse todos los reactivos a 2-8° C. Tras la reconstitución, almacene todos los reactivos a -15° C o menos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse una vez caducados. La fecha de caducidad del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de caducidad del trazador.

Cuando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibrador 0 de calcitonina: reactivo liofilizado

Tampón borato ASB con azida sódica (0,25%) añadida. Reconstituya el vial con 10 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.2 Calibrador de calcitonina II: reactivo liofilizado

Calcitonina humana sintética, con una concentración nominal de 1.000 pg/mL, diluida en tampón borato ASB con azida sódica (0,2%) y otros estabilizadores añadidos. Los valores de concentración exactos se asignan con cada lote. Reconstituya el vial con 1 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15-20 minutos en hielo picado hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar. Para obtener la curva de calibración completa, haga diluciones en serie añadiendo 500 µL de calibrador a 500 µL de calibrador 0. Por ejemplo, si la concentración del calibrador es 1.000 pg/mL, los calibradores 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/mL se obtienen de este modo:

Agregue 500 µL de calibrador 1.000 pg/mL a 500 µL de calibrador 0 y mezcle para obtener 500 pg/mL.

Agregue 500 µL de calibrador 500 pg/mL a 500 µL de calibrador 0 y mezcle para obtener 250 pg/mL.

Agregue 500 µL de calibrador 250 pg/mL a 500 µL calibrador 0 y mezcle para obtener 125 pg/mL.

Agregue 500 µL de calibrador 125 pg/mL a 500 µL de calibrador 0 y mezcle para obtener 62,5 pg/mL.

Agregue 500 µL de calibrador 62,5 pg/mL a 500 µL de calibrador 0 y mezcle para obtener 31,25 pg/mL.

PRECAUCIÓN: Deje los tubos en hielo picado mientras realiza las diluciones en serie y antes de utilizarlos en el ensayo. El calibrador de calcitonina de DiaSorin se ha analizado según el estándar 70/234 para calcitonina de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El calibrador ha demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utiliza con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico *in vitro*.

DESECHE EL EXCESO; NO LO CONGELE.

4.3 Antisuero de calcitonina: reactivo liofilizado

Suero de cabra anticalcitonina diluido en tampón borato ASB con azida sódica (0,1%) y tintura azul añadidas. Reconstituya el vial con 14 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.4 Calcitonina¹²⁵I: reactivo liofilizado

Calcitonina humana sintética marcada con yodo 125 y diluida en tampón borato ASB con EDTA y con azida sódica (0,4%) y tintura roja añadidas. Reconstituya el vial con 7 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.5 Complejo de precipitación de calcitonina: reactivo liofilizado

Suero normal de cabra pre-precipitado con suero de burro anticabra y polietilenglicol (PEG) diluido en tampón borato ASB con azida sódica (0,1%) añadida. Reconstituya el vial con 35 mL de agua purificada. Mezcle a fondo hasta homogeneizar la suspensión y deje reposar durante un mínimo de treinta minutos a temperatura ambiente mezclando cada cierto tiempo.

4.6 Controles de calcitonina (niveles 1 y 2): reactivo liofilizado

Suero humano preparado, en caso necesario, con la cantidad adecuada de calcitonina humana sintética para obtener una concentración dentro del rango especificado. Se añaden azida sódica (0,1%) y otros estabilizadores. Reconstituya el vial con 1 mL de agua purificada, mezcle y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo y trate la muestra como desconocida. Los rangos están impresos en los viales del control.

PRECAUCIÓN: DESECHE EL EXCESO; NO LO CONGELE.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátense como potencialmente infecciosos.

Todas las unidades de suero/plasma de donante usadas en la preparación de este producto se han comprobado mediante un método aprobado por la FDA estadounidense, demostrando no ser reactivas a la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no garantizan la detección de todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede garantizar plenamente la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4^a ed., mayo 1999 o actual, de los centros de control de enfermedades e institutos nacionales de salud y prevención.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Antes de desecharlos, enjuáguelos con abundante agua para evitar la acumulación de azidas. Para obtener más información, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" en Manual Guide-Safety Management n° CDC-22, publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO 125

Este equipo contiene material radiactivo que no excede de 1,5 μCi (55,5 kBq), equipo n° 25065, o 3 μCi (111 kBq), equipo n° 25130, de yodo 125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado únicamente al personal autorizado.
3. No distribuya material radiactivo con la pipeta en la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.

5. Las áreas donde se produzcan derrames deben limpiarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el prospecto del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS DEL EQUIPO

- 6.1 Presencia de partículas anómalas en alguno de los reactivos
- 6.2 Desviación en la pendiente o posición de la curva de calibración con respecto al resultado habitual
- 6.3 Disminución de la unión máxima
- 6.4 Alto nivel de uniones no específicas

7. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para el ensayo hacen falta por duplicado cien microlitros de suero.

Recoja la sangre por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 ó 10 mL. Centrifugue durante quince minutos con $760 \times g^*$ para obtener suero no hemolizado. Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservantes. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible.

La calcitonina es inestable a temperatura ambiente. Si el suero no se analiza inmediatamente, debe almacenarse a -15°C o menos. Los especímenes no deben someterse repetidamente a ciclos de congelación y descongelación.

8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 8.1 12 tubos desechables de vidrio de borosilicato de 75 mm. **No deben** emplearse tubos de plástico.
- 8.2 Centrífuga controlada por temperatura con capacidad para 12 tubos de 75 mm ($20-25^\circ \text{C}$)
- 8.3 Contador de centelleo de rayos gamma válido para yodo 125
- 8.4 Vórtex
- 8.5 Utensilios de dosificación:
 - a. Micropipetas calibradas para suministrar $100 \mu\text{L}$ y $200 \mu\text{L}$
 - b. Dispensadores repetitivos calibrados para suministrar $200 \mu\text{L}$ y $500 \mu\text{L}$
- 8.6 Agua purificada

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- 9.1 Descongele las muestras desconocidas y colóquelas en hielo picado.
- 9.2 Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los reactivos congelados que hubiera. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los $20-25^\circ \text{C}$. Mézclelos suavemente y colóquelos en hielo picado antes de utilizarlos.

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$

9.3 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos desechables de vidrio de borosilicato de 75 mm según el programa de ensayo de la última página.

9.4 **Coloque la gradilla de tubos en hielo picado.**

9.5 Añada los reactivos de este modo:

a. **Tubos de cuentas totales**

Reservar aparte hasta el paso 7.

b. **Unión no específica (NSB)**

100 µL de calibrador 0

c. **Calibrador 0**

100 µL de calibrador 0

200 µL de antisuero de calcitonina (azul)

d. **Calibradores de calcitonina**

100 µL de calibrador de calcitonina

200 µL de antisuero de calcitonina (azul)

e. **Control de calidad y muestras desconocidas**

100 µL de suero

200 µL de antisuero de calcitonina (azul)

9.6 Agite los tubos suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube durante 16-24 horas a 2-8° C.

9.7 Añada 100 µL de calcitonina ¹²⁵I (roja) a todos los tubos.

9.8 Agite los tubos suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube durante 16-24 horas a 2-8° C.

9.9 Mezcle enérgicamente el complejo de precipitación; añada 500 µL a todos los tubos salvo a los de cuentas totales.

9.10 Agite los tubos suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube durante 15-25 minutos a 20-25° C.

9.11 Centrifugue con 760 x g* durante veinte minutos a 20-25° C.

9.12 Decante inmediatamente el sobrenadante de todos los tubos, salvo los de las cuentas totales, invirtiéndolos durante dos minutos como máximo. Antes de poner los tubos boca arriba, séquelos con papel secante para eliminar las gotas de sobrenadante que puedan haber quedado en los bordes.

9.13 Determine el número de cuentas de precipitado de cada tubo y de los tubos de cuentas totales dejándolos en un contador de centelleo de rayos gamma durante el tiempo suficiente para obtener precisión estadística (consulte el apartado Limitaciones del procedimiento).

10. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

10.1 Añada cada alícuota de reactivo al tercio inferior del tubo de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.

10.2 Los tubos de ensayo deben colocarse en hielo picado para evitar valores elevados falsos.

10.3 Los tubos desechables de vidrio de borosilicato de algunos fabricantes producen uniones no específicas elevadas. **No utilice** tubos de plástico en este ensayo.

10.4 Si prefiere aspirar el sobrenadante del precipitado, tenga cuidado de no alterar el precipitado.

$$* \quad g = (1118 \times 10^{-9}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

10.5 Para asegurar completamente el resultado sólido del ensayo RIA, deben comprobarse varios factores adicionales. DiaSorin recomienda comprobar los siguientes parámetros para asegurar los resultados uniformes del equipo.

a. Cuentas totales

b. Unión máxima

Promedio de cuentas por minuto (CPM) de los tubos de calibrador 0/Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales

c. Uniones no específicas

Promedio de CMP de los tubos NSB/Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales

d. Pendiente de la curva de calibración

Por ejemplo, controle los puntos de inhibición de 80, 50 y 20% de la línea de calibración.

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos sueros de control en cada ensayo para asegurar la validez de los resultados obtenidos. Debe determinarse una desviación media y estándar para cada control con un mínimo de diez ensayos. De este modo se puede obtener un rango aceptable de valores para estos controles usando ± 2 desviaciones estándar de los valores previamente determinados. El laboratorio de control de calidad de DiaSorin ha determinado un rango para los sueros de control de calidad que se incluyen en este equipo.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibración que relacione el alcance de la unión con diferentes concentraciones de los calibradores de calibración. El gráfico puede tener una escala lineal o logarítmica. Cada uno de estos métodos indica básicamente los mismos valores para controles y muestras, aunque algunos ensayos pueden “ajustarse” mejor a un método determinado que a otro. El método de cálculo del laboratorio de control de calidad de DiaSorin es B/B_0 % frente a concentración logarítmica.

12.1 Calcule el promedio de CMP de cada calibrador, control y muestra desconocida.

12.2 Reste el promedio de CPM de los tubos NSB de todas las cuentas.

12.3 Divida las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra desconocida por las CPM corregidas del calibrador 0.

$$B/B_0 \% = \frac{\text{CPM de calibrador o muestra desconocida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

12.4 Con un papel milimetrado semilogarítmico de 2 ciclos o log-logit, trace el B/B_0 porcentual de los calibradores de calcitonina (eje de ordenadas) frente a la concentración (eje de abscisas).

12.5 Una los puntos con una línea de ajuste óptimo.

12.6 Interpole los niveles de calcitonina en las muestras desconocidas del trazado.

12.7 Si la lectura de una muestra desconocida es superior a la del calibrador más alto, debe diluirse con calibrador 0 y volverse a someter al ensayo.

12.8 Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala hasta obtener el factor de dilución adecuado.

12.9 Calcule la unión máxima dividiendo las CPM del calibrador 0 por el promedio de cuentas totales obtenido con los tubos de cuentas totales.

TABLA II Ejemplo de datos de un ensayo RIA para calcitonina II de DiaSorin						
Tubo	CPM duplicadas	CPM medias	CPM corregidas	% unión (B/T)	% (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Total	17.943 18.128	18.036				
NSB	878 824	851		4,7		
Calibrador 0	8.055 8.049	8.052	7.201	39,9	100	
Calibradores (pg/mL)						
A (35)	7.344 7.211	7.278	6.427		89,3	
B (70)	6.969 6.649	6.809	5.958		82,8	
C (140)	5.390 5.476	5.433	4.582		63,7	
D (280)	3.628 3.725	3.676	2.826		39,3	
E (560)	2.301 2.286	2.293	1.442		20	
F (1.120)	1.519 1.546	1.532	682		9,5	
Muestras desconocidas						
1	6.087 5.940	6.014	5.162		71,7	115
2	4.796 5.012	4.904	4.053		56,3	163

La TABLA II Y LA FIGURA 1 MUESTRAN EJEMPLOS DE DATOS Y DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN 1; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

Ejemplo de curva de calibración de calcitonina II

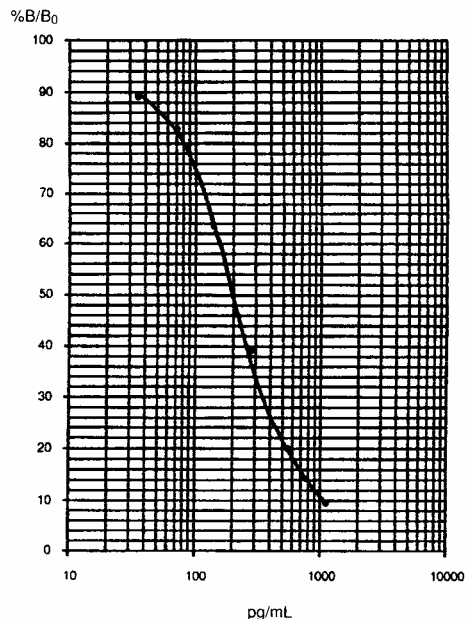


FIGURA 1

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 13.1 Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto, diluya sólo con calibrador 0.
- 13.2 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores estadísticos (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%; 10.000 CPM dará como resultado un 1% de error).
- 13.3 El laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza el ajuste de curva suavizada spline.

14. VALORES PREVISTOS

Rango normal

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. Los valores normales observados en el laboratorio de DiaSorin han sido de 47 (± 24 pg/mL). Esto daría como resultado un rango normal (2 desv. est.) de valores no detectables (ND) - 95. El tabaco puede provocar niveles ligeramente elevados de calcitonina sérica.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RESULTADO

15.1 Precisión

Variación intraensayo media

	Valor de la media (pg/mL)	D.E.	% C.V.
Baja	67,3	10,1	14,8
Media	278,5	18,9	6,7
Alta	530	30,7	5,7

Variación interensayo

	Valor de la media (pg/mL)	D.E.	% C.V.
Baja	92,76	13,42	14,47
Media	142,55	16,55	11,61
Alta	528,79	36,7	6,95

15.2 VERACIDAD: LA VERACIDAD DEL ENSAYO SE HA VERIFICADO CON LA PRUEBA DE LINEALIDAD Y LA DE RECUPERACIÓN.

Linealidad (paralelismo)

Estudio de dilución en serie de cuatro muestras desconocidas

Número de la muestra	No diluida (pg/mL)	1/2	1/4	1/8
1	534	624,5	663,7	696,1
2	277,2	291,8	346,5	289,4
3	975,6	1216,9	1396,8	1487,6
4	819,3	1047,9	1144,2	1081

Recuperación

Se han diluido cinco muestras desconocidas 1:1 con calibradores 0, 48, 96, 193, 385, 770 y 1.540 pg/mL. Después se han analizado las diluciones y se ha calculado un porcentaje de recuperación media general por cada muestra desconocida utilizada.

Número de la muestra	Recuperación media general (%)
1	105
2	83
3	77
4	85
5	85

15.3 Sensibilidad analítica

Cuando se define como la concentración evidente con 3 desviaciones estándar de las cuentas a unión máxima, la cantidad mínima detectable es de 1,5 pg/tubo (15 pg/mL).

15.4 Especificidad analítica

La comparación de la reactividad cruzada del anticuerpo de calcitonina se realizó con los siguientes péptidos:

Péptido	% de reactividad cruzada
Hormona paratiroidea	< 0,01
Insulina	< 0,01
Hormona de estimulación de la tiroides	< 0,01
Hormona adrenocorticotrópica	< 0,01
Prolactina	< 0,01

La calcitonina de salmón no presenta reactividad cruzada con los antisueros. La calcitonina de rata sí, por lo que el ensayo puede utilizarse en estudios con ratas.

15.5 Interferencia

Se han realizado estudios de interferencia con el documento EP7-A del NCCLS como pauta para evaluar los efectos de las interferencias endógenas comunes. Los valores obtenidos han mostrado interferencias con la adición de triglicéridos y hemoglobina. La adición de colesterol y bilirrubina no ha afectado a los resultados.

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

PROGRAMA DEL ENSAYO

1. Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 25° C. Mézclelos suavemente y colóquelos en hielo picado antes de utilizarlos.
2. Identifique los tubos por duplicado. Coloque la gradilla de tubos en hielo picado.
3. Suministre los reactivos según el siguiente programa.

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	NSB	Cal. 0-5	Controles y muestras desconocidas
Calibrador 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibradores (1-6)	-	-	100 µL	-
Controles extraídos	-	-	-	100 µL
Muestras desconocidas extraídas	-	-	-	100 µL
Antisuero	-	-	200 µL	200 µL

4. Cubra los tubos con parafilm y agítelos suavemente en vórtex.
5. Incube durante 16–24 horas a 2-8° C.
6. Dispense 100 µL de trazador en todos los pocillos.
7. Cubra y agite suavemente en vórtex.
8. Incube durante 16-24 horas a 2-8° C.
9. Dispense 500 µL de complejo de precipitación en todos los pocillos excepto en los tubos de cuentas totales.
10. Incube durante 15-25 minutos a 20-25° C.
11. Centrifugue con 760 x g* durante 20 minutos.
12. Decante los sobrenadantes.
13. Cuento cada tubo en un contador gamma durante 60 segundos o más.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA DI CALCITONINA

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Questo kit contiene istruzioni e materiali per la determinazione quantitativa della calcitonina nel siero umano mediante analisi radioimmunologica (RIA).

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La calcitonina è un ormone di natura peptidica, di peso molecolare 3,418, e contiene 32 aminoacidi:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
H-Cys-	Gly-	Asn-Leu-	Ser-	Thr-	Cys-Met-	Leu-	Gly-	Thr-	Tyr-	Thr-	Gln-	Asp-Phe-	Asn-			
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Lys-	Phe-	His-	Thr-	Phe-Pro-	Gln-Thr-	Ala-	Ile-	Gly-	Val-	Gly-Ala-	Pro-	NH ₂				

Nell'uomo, l'ormone ipocalcemizzante è secreto dalle cellule parafollicolari tiroidee di origine neuroectoderma, probabilmente in risposta ad ipercalcemia.^{10,14} Le attività ipocalcemizzanti della calcitonina sono mediate dagli effetti su ossa e rene.⁶

DiaSorin ha sviluppato e accuratamente testato una analisi radioimmunologica (RIA) calcitonina sensibile in grado di rilevare le concentrazioni di calcitonina (CT) fino a un minimo di 15 pg/mL. L'impiego principale dell'analisi RIA per calcitonina è la rilevazione sierologica di crescite maligne. Il cancro della tiroide midollare (Medullary thyroid cancer, MTC), che comprende il 4-8% dei tumori tiroidei, secreta calcitonina in eccesso. Livelli molto elevati di calcitonina in circolo, rilevati mediante analisi RIA, sono utili per stabilire questo tipo di tumore.^{5,7,11,21} Alcuni tipi di questo cancro MTC sono di natura ereditaria, ed è importante controllare in **tutti** i membri di una famiglia l'eccesso di calcitonina quando si scopre un caso. Altri utilizzi dell'analisi RIA per calcitonina prevedono l'indagine di produzione ectopica di calcitonina in pazienti affetti da cancro, in particolare quelli con tumore al seno e ai polmoni.^{4,9,13,18,24} Sono in corso indagini molto attive al fine di stabilire l'utilità delle misurazioni di calcitonina nella individuazione di tumori maligni di tipo non tiroideo.^{8,16,19}

3. PRINCIPI DELL'ANALISI

L'analisi RIA DiaSorin Calcitonina II è una procedura di disequilibrio che prevede l'aggiunta ritardata di tracciante per aumentare la sensibilità. L'anticorpo è stato creato in una capra utilizzando calcitonina umana pura in forma sintetica. Nell'analisi RIA, il campione e il primo anticorpo vengono combinati e incubati per 16-24 ore alla temperatura di 2-8°C. Dopo l'aggiunta di tracciante, ha luogo una seconda incubazione di 16-24 ore a 2-8°C. Viene aggiunto un complesso pre-precipitante il secondo anticorpo per separare il legato dal tracciante libero. L'analisi può essere quindi centrifugata e lasciata decantare dopo 15-20 minuti di incubazione a 20-25°C.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratore 0 di calcitonina	1 fiala/10 ml	2 fiale/10 mL
Calibratore di calcitonina	2 fiale/1,0 mL	4 fiale/1,0 mL
Antisiero calcitonina	1 fiala/14 mL	2 fiale/14 mL
Calcitonina ¹²⁵ I	1 fiala/7 mL	2 fiale/7 mL
Complesso precipitante di calcitonina	1 fiala/35 mL	2 fiale/35 mL
Controlli per calcitonina	2 fiale/1,0 mL	4 fiale/ 4,0 mL
Numero di test	65	130

CONSERVAZIONE: Dopo il ricevimento dei reagenti e prima della ricostituzione, conservarli a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, conservare tutti i reagenti a -15° o a una temperatura inferiore, fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Non si devono mescolare reagente di lotti diversi.

4.1 Calibratore 0 di calcitonina: reagente liofilizzato

Tampone BSA-borato con aggiunta di sodio azide (0,25%). Ricostituire la fiala con 10 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare completamente prima dell'uso.

4.2 Calibratore Calcitonina II: reagente liofilizzato

La calcitonina sintetica umana, a concentrazione nominale di 1.000 pg/mL, è diluita in un tampone BSA-borato contenente sodio azide (0.2%) con aggiunta di altri stabilizzanti. I valori esatti della concentrazione vengono indicati per ogni lotto. Ricostituire la fiala con 1,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti su ghiaccio tritato fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso. Per ottenere l'intera curva di calibrazione, fare diluizioni in serie aggiungendo 500 µL di calibratore a 500 µL di calibratore 0. Ad esempio, se la concentrazione del calibratore è 1.000 pg/mL, i calibratori da 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 pg/mL saranno così composti:

Aggiungere 500 µL di calibratore 1.000 pg/mL a 500 µL di calibratore 0 e mescolare per ottenere 500 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 500 pg/mL a 500 µL di calibratore 0 e mescolare per ottenere 250 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 250 pg/mL a 500 µL di calibratore 0 e mescolare per ottenere 125 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 125 pg/mL a 500 µL di calibratore 0 e mescolare per ottenere 62,5 pg/mL.

Aggiungere 500 µL di calibratore 62,5 pg/mL a 500 µL di calibratore 0 e mescolare per ottenere 31,25 pg/mL.

AVVERTENZA: Tenere le provette su ghiaccio tritato mentre si eseguono le diluizioni in serie e prima dell'uso nell'analisi. Il calibratore DiaSorin è stato analizzato in base allo standard di riferimento 70/234 per la calcitonina dell'OMS. Il calibratore dimostra commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, come consigliato.

SCARTARE L'ECCEDENTE; NON CONGELARE.

4.3 Antisiero calcitonina: reagente liofilizzato

Il siero capra anti-calcitonina viene diluito in un tampone BSA-borato con sodio azide (0,1%) con l'aggiunta di colorante blu. Ricostituire la fiala con 14 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.4 ¹²⁵I Calcitonina: reagente liofilizzato

La calcitonina umana sintetica è etichettata con iodio-125 e diluita in un tampone BSA-borato-EDTA contenente sodio azide (0,4%) con l'aggiunta di colorante rosso. Ricostituire la fiala con 7 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare delicatamente prima dell'uso.

4.5 Complesso precipitante di calcitonina: reagente liofilizzato

Il siero normale di capra, pre-precipitato con siero asino anti-capra e polietilene glicolico (PEG), viene diluito in un tampone BSA-borato con l'aggiunta di sodio azide (0,1%). Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua purificata. Mescolare accuratamente fino a quando la sospensione si presenta omogenea, quindi lasciar riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente mescolando occasionalmente.

4.6 Controlli di calcitonina (Livello 1 e 2): reagente liofilizzato

Nel siero umano si aggiunge, se necessario, una quantità necessaria di calcitonina umana sintetica in modo da ottenere una concentrazione nei range specificati. Vengono aggiunti sodio azide (0,1%) e altri stabilizzanti. Ricostituire la fiala con 1,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciar riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente e trattare come campione non noto. I range sono stampati sulle fiale dei controlli.

AVVERTENZA: SCARTARE L'ECCEDENTE; NON CONGELARE.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi a HCV e anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuali dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua per evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, 1976.

Fra di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 1.5 μ Ci (55.5 kBq) Kit n. 25065 o 3 μ Ci (111 kBq) Kit n. 25130 di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.

5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica: L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

- 6.1 La presenza di particolato anomalo in uno qualsiasi dei reagenti.
- 6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.
- 6.3 Una diminuzione del legame massimo.
- 6.4 Un legame altamente non specifico.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Sono richiesti cento (100) microlitri, in due serie, di siero per l'analisi.

Prelevare il sangue mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. Centrifugare per quindici minuti a $760 \times g^*$ per ottenere siero privo di emolisi. Non sono richiesti additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione. Si consigliano campioni prelevati a digiuno, anche se non obbligatorio.

La calcitonina è instabile a temperatura ambiente. Se il siero non viene analizzato immediatamente, deve essere conservato a una temperatura di -15°C o inferiore. I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 8.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm. **Non** usare provette in plastica.
- 8.2 Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm ($20-25^{\circ}\text{C}$).
- 8.3 Contatore ad emissione di scintille gamma adatto per il conteggio di iodio-125.
- 8.4 Mixer Vortex.
- 8.5 Dispositivi per operazioni con pipetta:
 - a. Micropipette calibrate per erogare 100 μL e 200 μL .
 - b. Dosatori a ripetizione calibrati per erogare 200 μL e 500 μL .

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$

8.6 Acqua purificata

9. PROCEDURA DI ANALISI

- 9.1 Scongellare i campioni non noti e metterli su ghiaccio tritato.
- 9.2 Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 20-25°C. Mescolare delicatamente e metterli sul ghiaccio prima di utilizzarli.
- 9.3 Preparare ed etichettare due serie di 12 provette in vetro borosilicato monouso da 75 mm in base allo Schema di analisi sul retro della copertina.
- 9.4 **Mettere il portaprovette, con le provette, sul ghiaccio tritato.**
- 9.5 Aggiungere i reagenti nel seguente modo:
 - a. **Provette per il conteggio totale**
Lasciare da parte fino al punto 7
 - b. **Legame aspecifico (NSB)**
100 µL di calibratore 0
 - c. **Calibratore 0**
100 µL di calibratore 0
200 µL di antisiero calcitonina (blu)
 - d. **Calibratori di calcitonina**
100 µL calibratore di calcitonina
200 µL di antisiero calcitonina (blu)
 - e. **Controllo di qualità e campioni non noti**
100 µL di siero
200 µL di antisiero calcitonina (blu)
- 9.6 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
- 9.7 Aggiungere 100 µL di calcitonina ¹²⁵I (rosso) in tutte le provette.
- 9.8 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
- 9.9 Agitare vigorosamente il complesso precipitante; aggiungere 500 µL in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.
- 9.10 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 15-25 minuti a 20-25°C.
- 9.11 Centrifugare a 760 x g* per venti minuti a 20-25°C.
- 9.12 Lasciare immediatamente decantare i liquidi superficiali in tutte le provette, eccetto quelle per il conteggio totale, capovolgendole per un massimo di due minuti. Asciugare le provette con carta assorbente per eliminare eventuali gocce di liquidi superficiali che possono essere rimaste sui bordi prima di riportarle in posizione verticale.
- 9.13 Usando un contatore ad emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e delle provette per il conteggio totale per un tempo sufficiente a raggiungere la precisione statistica (vedere la sezione Limiti della procedura).

10. COMMENTI ALLA PROCEDURA

- 10.1 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.
- 10.2 Le provette dovranno essere messe su ghiaccio tritato per evitare valori erroneamente elevati.
- 10.3 Alcune provette monouso in vetro borosilicato di alcuni costruttori possono dare legami aspecifici elevati. **Non** utilizzare provette in plastica per questa analisi.

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$

10.4 Se si decide di aspirare il liquido superficiale dal precipitato, fare attenzione a non smuovere quest'ultimo.

10.5 Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit:

a. Conteggi totali

b. Legame massimo

Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0 /CPM medio delle provette per il conteggio totale.

c. Legame non specifico

Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette NSB /CPM medio delle provette per il conteggio totale.

d. Pendenza della curva del calibratore

Ad esempio, monitorare i punti di soppressione a 80, 50 e 20% della linea del calibratore.

11. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due sieri di controllo in ogni analisi per garantire la validità dei risultati di ogni analisi. Determinare quindi la deviazione media e standard per ogni controllo usando un minimo di dieci analisi. Si può quindi ottenere un range accettabile di valori per questi controlli utilizzando ± 2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di Controllo della Qualità DiaSorin ha stabilito un range per i sieri di controllo qualità inclusi nel kit.

12. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B_0 rispetto alla concentrazione di log.

12.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.

12.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.

12.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione non noto per il CPM corretto del calibratore 0.

$$B/B_0 \% = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto} - \text{CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0} - \text{CPM di NSB}} \times 100$$

12.4 Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica a due cicli, tracciare la percentuale di B/B_0 per i calibratori di calcitonina (asse verticale) rispetto alla concentrazione (asse orizzontale).

12.5 Tracciare una linea di miglior interpolazione fra i punti.

12.6 Interpolare i livelli di calcitonina nei campioni non noti dal tracciato.

12.7 Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito correttamente con il calibratore 0 e analizzato nuovamente.

12.8 Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.

12.9 Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.

TABELLA II					
Dati campione DiaSorin Calcitonina II RIA					
Provetta	CPM duplicato	Media CPM	CPM corretto	Percent. legato (B/T)	Percent. Conc. (B/B ₀)(pg/mL)
Conteggio totale	17.943 18.128	18.036			
NSB	878 824	851		4,7	
Calibratore 0	8.055 8.049	8.052	7.201	39,9	100,0
Calibratori (pg/mL)					
A (35,0)	7.344 7.211	7.278	6.427		89,3
B (70,0)	6.969 6.649	6.809	5.958		82,8
C (140)	5.390 5.476	5.433	4.582		63,7
D (280)	3.628 3.725	3.676	2.826		39,3
E (560)	2.301 2.286	2.293	1.442		20,0
F (1.120)	1.519 1.546	1.532	682		9,5
Campioni non noti					
1	6.087 5.940	6.014	5.162		71,7 115
2	4.796 5.012	4.904	4.053		56,3 163

I dati di campioni tipici e una curva di calibrazione sono riportati nella TABELLA II e nella FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

Esempio di curva di calibrazione Calcitonina II

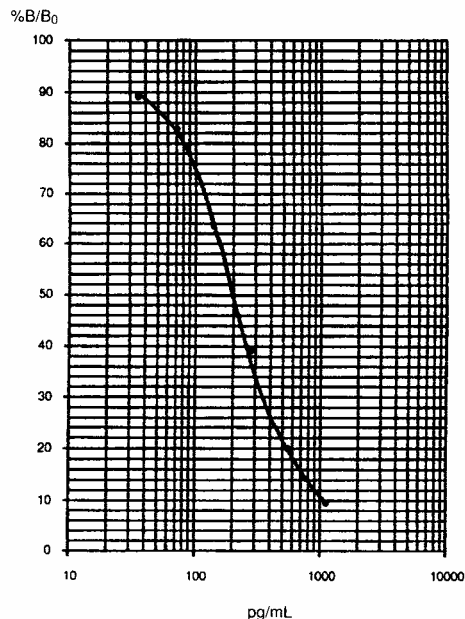


FIGURA 1

13. LIMITI DELLA PROCEDURA

- 13.1** Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del calibratore superiore, diluire solo con il Calibratore 0.
- 13.2** Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).
- 13.3** Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin utilizza una retta curvilinea uniforme.

14. VALORI PREVISTI

Range normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio. I valori normali osservati nei laboratori DiaSorin sono risultati pari a 47 (± 24 pg/mL). Tali valori determinerebbero un range normale (due deviazioni standard) di non rilevabile (ND) pari a -95. Il fumo potrebbe dare livelli di calcitonina nel siero leggermente elevati.

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Precisione

Variazione media intra-analisi

	Valore medio (pg/mL)	D.S.	(% C.V.)
BASSO	67,3	10,1	14,8
MEDIO	278,5	18,9	6,7
ALTO	530	30,7	5,7

Variazione intra-analisi

	Valore medio (pg/mL)	D.S.	(% C.V.)
BASSO	92,76	13,42	14,47
MEDIO	142,55	16,55	11,61
ALTO	528,79	36,7	6,95

15.2 ACCURATEZZA: L'ACCURATEZZA DELL'ANALISI È STATA VERIFICATA MEDIANTE TEST DI LINEARITÀ E TEST DI RECUPERO.

Linearità (Parallelismo)

Studio di diluizione seriale di quattro campioni non noti

Numero campione	Non diluito (pg/mL)	1/2	1/4	1/8
1	534	624,5	663,7	696,1
2	277,2	291,8	346,5	289,4
3	975,6	1216,9	1396,8	1487,6
4	819,3	1047,9	1144,2	1081

Recupero

Cinque campioni non noti sono stati diluiti 1:1 con i calibratori 0, 48, 96, 193, 385, 770 e 1.540 pg/mL. Ogni diluizione è stata quindi analizzata ed è stato calcolato il recupero medio complessivo in percentuale per ogni campione non noto utilizzato.

Numero campione	Recupero medio complessivo (%)
1	105
2	83
3	77
4	85
5	85

15.3 Sensibilità analitica

La quantità minima rilevabile, se definita come concentrazione apparente a tre deviazioni standard dai conteggi a legame massimo, è di 1,5 pg/provetta (15 pg/mL).

15.4 Specificità analitica

Il confronto della reattività incrociata dell'anticorpo calcitonina è stato eseguito con i seguenti peptidi:

Peptide	% di reattività incrociata
Ormone paratiroideo	< 0,01
Insulina	< 0,01
Ormone tireostimolante	< 0,01
Ormone adrenocorticotropo	< 0,01
Prolattina	< 0,01

La calcitonina di salmone non presenta reazione incrociata con gli antisieri. La calcitonina di topo non presenta reazione incrociata e l'analisi può essere utilizzati negli studi sui topi.

15.5 Interferenza

Studi di interferenza sono stati eseguiti in base alle linee guida NCCLS EP7-A per valutare gli effetti degli agenti interferenti endogeni comuni. I valori ottenuti hanno dimostrato un'interferenza dovuta all'aggiunta di trigliceridi ed emoglobina. L'aggiunta di colesterolo e bilirubina non ha influito sui risultati.

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

SCHEMA DI ANALISI

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni surgelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Mescolare accuratamente, quindi mettere su ghiaccio tritato prima dell'uso.
2. Contrassegnare due serie di provette. Mettere il portaprovette, con le provette, su ghiaccio tritato.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	NSB	CAL 0-5	Controlli e campioni non noti
Calibratore 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibratori (1-6)	-	-	100 µL	-
Controlli estratti	-	-	-	100 µL
Campioni non noti estratti	-	-	-	100 µL
Antisiero	-	-	200 µL	200 µL

4. Coprire le provette con pellicola e agitare lentamente nel Vortex.
5. Lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
6. Versare 100 µL di tracciante in tutti i recipienti.
7. Coprire e agitare lentamente nel Vortex.
8. Lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
9. Versare 500 µL di complesso precipitante in tutti i recipienti, eccetto le provette per il conteggio totale.
10. Lasciare in incubazione per 15-25 minuti a 20-25°C.
11. Centrifugare a 760 x g* per 20 minuti.
12. Far decantare i liquidi superficiali.
13. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

RADIOIMMUNOASSAY FÖR KALCITONIN

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Satsen innehåller anvisningar och materiel för kvantitativ bestämning av humant kalcitonin i serum med radioimmunoassay (RIA).

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Kalcitonin är ett peptidhormon med en molekylvikt på 3 418, uppbyggt av 32 aminosyror:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
H-Cys- Gly- Asn- Leu- Ser- Thr- Cys- Met- Leu- Gly- Thr- Tyr- Thr- Gln- Asp- Phe- Asn-
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
Lys- Phe- His- Thr- Phe- Pro- Gln- Thr- Ala- Ile- Gly- Val- Gly- Ala- Pro- NH₂

Det är ett blodkalciumsänkande hormon och utsöndras hos människor, troligen som svar på hyperkalcemi, av sköldkörtelns parafollikulära celler, som är av neuroektodermalt ursprung.^{10,14} De hypokalcemiska effekterna medieras genom effekter på benväv och njure.⁶

DiaSorin har tagit fram och noggrant testat en känslig radioimmunassay (RIA) som kan påvisa så låga kalcitoninhalter som 15 pg/mL. Det primära användningsområdet för kalcitonin-RIA är för att på serologisk väg påvisa maligna tumörer. Vid medullär sköldkörtelcancer (MTC), som utgör 4-8 % av alla sköldkörteltumörer, utsöndras det förhöjda mängder av kalcitonin. För bedömning av denna tumörtyp är ett påvisande med RIA av mycket höga halter av cirkulerande kalcitonin ett värdefullt fynd.^{5,7,11,21}

Vissa av tumörerna är ärftliga, och det är viktigt att screena **alla** i en släkt för förhöjda kalcitoninvärden när ett fall upptäcks. Andra användningsområden för kalcitonin-RIA är utredning av ectopisk kalcitoninproduktion hos cancerpatienter, speciellt patienter med bröst- och lungtumörer.^{4,9,13,18,24} Mycket aktiva forskningsinsatser görs för närvarande för att utreda hur användbara kalcitoninmätningar är vid utvärdering av maligniteter utanför sköldkörteln.^{8,16,19}

3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin Calcitonin II RIA Kit är baserad på en metod utan jämviktning, där man använder en fördröjd tillsats av spårämne för att öka känsligheten. Antikropparna härrör från get och är riktade mot rent, syntetiskt, humant kalcitonin. I denna RIA blandas prov och primärantikropp och inkuberas 16-24 timmar vid 2-8 °C. Därefter tillsätts spårämnet, varpå man inkuberar en andra gång 16-24 timmar vid 2-8°C. Ett förutfärdt sekundärantikroppskomplex tillsätts för att separera bundet och fritt spårämne. Assayen kan därefter centrifugeras och dekanteras efter 15-20 minuters inkubation vid 20-25 °C.

4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

Kalcitoninkalibreringslösning 0	1 flaska à 10 mL	2 flaskor à 10 mL
Kalcitoninkalibreringslösning	2 flaskor à 1,0 mL	4 flaskor à 1,0 mL
Kalcitoninantiserum	1 flaska à 14 mL	2 flaskor à 14 mL
¹²⁵ I-kalcitonin	1 flaska à 7 mL	2 flaskor à 7 mL
Kalcitoninutfällningskomplex	1 flaska à 35 mL	2 flaskor à 35 mL
Kalcitoninkontroller	2 flaskor à 1,0 mL	4 flaskor à 1,0 mL
Antal test	65	130

FÖRVARING: Före rekonstituering skall alla reagens förvaras vid 2-8°C. Efter rekonstituering förvaras alla reagens vid högst -15°C till det utgångsdatum som anges på etiketten. Reagensen får ej användas efter utgångsdatum. Utgångsdatum för satsen anges på etiketten på ytterförpackningen och motsvarar utgångsdatum för spårämnet.

När man rekonstituerar innehållet i flaskorna måste man blanda försiktigt för att undvika skumbildning. Reagens från skilda batcher får ej blandas.

4.1 Kalcitoninkalibreringslösning 0: frystorkat reagens

BSA-boratbuffert med tillsats av 0,25 % natriumazid. Rekonstituera flaskans innehåll med 10 mL renat vatten, blanda om och låt stå 15 - 20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst; blanda noga före användning.

4.2 Kalcitonin II-kalibreringslösning: frystorkat reagens

Humant syntetiskt kalcitonin med en nominell halt på 1 000 pg/mL, upplöst i BSA-boratbuffert med tillsats av natriumazid (0,2%) och andra stabiliserande medel. De exakta koncentrationvärdena anges för varje batch. Rekonstituera flaskans innehåll med 1,0 mL renat vatten, blanda om och låt stå 15 - 20 minuter på krossad is tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda noga före användning. För att få en fullständig kalibreringskurva gör man seriespädningar genom att tillsätta 500 µL kalibreringslösning till 500 µL kalibreringslösning 0. Om halten i kalibreringslösningen exempelvis är 1 000 pg/mL, bereder man kalibreringslösningar med 500, 250, 125, 62,5 and 31,25 pg/mL på följande sätt:

Tillsätt 500 µL av kalibreringslösningen med 1 000 pg/mL till 500 µL kalibreringslösning 0 och blanda, så erhålls 500 pg/mL.

Tillsätt 500 µL av kalibreringslösningen med 500 pg/mL till 500 µL kalibreringslösning 0 och blanda, så erhålls 250 pg/mL.

Tillsätt 500 µL av kalibreringslösningen med 250 pg/mL till 500 µL kalibreringslösning 0 och blanda, så erhålls 125 pg/mL.

Tillsätt 500 µL av kalibreringslösningen med 125 pg/mL till 500 µL kalibreringslösning 0 och blanda, så erhålls 62,5 pg/mL.

Tillsätt 500 µL av kalibreringslösningen med 62,5 pg/mL till 500 µL kalibreringslösning 0 och blanda, så erhålls 31,25 pg/mL.

FÖRSIKTIGT! Låt rören stå på krossad is medan seriespädningarna görs i ordning och fram till dess de används i assayen. DiaSorins kalcitoninkalibreringslösning har kalibrerats mot Världshälsoorganisationens kalcitoninstandard 70/234. Kalibreringslösningen fungerar på samma sätt som patientprover när den används på rekommenderat sätt med reagensen och metoden i detta diagnostiska *in vitro*-test.

KASSERA EVENTUELL ÖVERBLIVEN LÖSNING; FÅR EJ FRYSAS.

4.3 Kalcitoninantiserum: frystorkat reagens

Getserum mot kalcitonin spätt med BSA-boratbuffert med natriumazid (0,1%) och blått färgämne tillsatt. Rekonstituera flaskans innehåll med 14 mL renat vatten, blanda om och låt stå 15 - 20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst; blanda noga före användning.

4.4 ¹²⁵I-kalcitonin: frystorkat reagens

Syntetiskt humant kalcitonin, inmärkt med jod-125 och löst i BSA-borat-EDTA-buffert med tillsats av natriumazid (0,4 %) och rött färgämne. Rekonstituera flaskans innehåll med 7 mL renat vatten, blanda om och låt stå 15-20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst. Blanda försiktigt före användning.

4.5 Kalcitoninutfällningskomplex: frystorkat reagens

Normalt getserum förutfällt med antigetserum från åsna och polyetylenglykol (PEG), spätt med BSA-boratbuffert med tillsats av 0,1 % natriumazid. Rekonstituera flaskans innehåll med 35 mL renat vatten. Blanda noga tills suspensionen ser homogen ut och låt den sedan stå minst 30 minuter i rumstemperatur. Blanda då och då.

4.6 Kalcitoninkontroller (nivå 1 och nivå 2): frystorkat reagens

Humant serum med tillsats (vid behov) av lämplig mängd syntetiskt humant kalcitonin för att erhålla en halt inom det angivna området. Med tillsats av 0,1 % natriumazid och andra stabiliserande medel. Rekonstituera innehållet i flaskan med 1,0 mL renat vatten, blanda om och låt stå 15-20 minuter tills innehållet är fullständigt upplöst; blanda noga och behandla som ett okänt prov. Haltintervallet anges på flaskorna med kontrollen.

FÖRSIKTIGT! KASSERA EVENTUELL ÖVERBLIVEN LÖSNING; FÅR EJ FRYSAS.

5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK *IN VITRO*.

Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

Behandlas som potentiellt smittfarligt.

Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk (FDA) och befunnits negativ vad gäller förekomst av HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder. Se handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga.

REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

FÖRSIKTIGT! Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1976.

Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material (jod-125) med en radioaktivitet som ej överstiger 1,5 μCi (55,5 kBq sats nr 25065) eller 3 μCi (111 kBq - sats nr 25130). Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:

Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester *in vitro* eller laboratorietester *in vitro*, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens: När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

WARNING! Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

OBSERVERA! Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETSFÖRSÄMRING HOS REAGENSEN I SATSEN

- 6.1 Förekomst av onormalt partikelformigt material i något av reagensen.
- 6.2 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som normalt erhålles.
- 6.3 En sänkning av maximal bindning.
- 6.4 En hög ospecifik bindning

7. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Det behövs dubbelprov à etthundra (100) mikroliter serum för assayen.

Tag venprov i 5 eller 10 mL glasrör av vacutainertyp. Centrifugera proverna i 15 minuter vid $760 \times g^*$ så att hemolysfritt serum erhålles. Inga tillsatser eller konserveringsmedel behövs för att hålla proverna intakta. Alla plastartiklar, glasvaror och annan materiel som kommer i kontakt med proverna måste vara fullkomligt fria från kontaminerande material. Fastprov rekommenderas men är ej ett krav.

Kalcitonin är labilt vid rumstemperatur. Om serumet inte testas omedelbart, skall det förvaras vid -15°C eller kallare. Proverna får ej tinas och frysas flera gånger.

8. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

- 8.1 Engångs borosilikatrör, 12 x 75 mm. Plaströr **får ej** användas.
- 8.2. Temperaturreglerad centrifug som passar för 12 x 75 mm-rör ($20-25^\circ\text{C}$).
- 8.3 Gammaräknare som kan räkna jod-125.
- 8.4 Vortex-blandare.
- 8.5 Pipetteringshjälpmedel
 - a. Mikropipetter kalibrerade för 100 μL och 200 μL .
 - b. Repeterande dispensorer kalibrerade för 200 μL och 500 μL .
- 8.6 Renat vatten

9. TESTPROCEDUR

- 9.1 Tina patientprover och ställ dem på krossad is.
- 9.2 Rekonstituera de frystorkade reagensen och låt frysta reagens tina fullständigt. Se till att reagensen ej blir varmare än $20-25^\circ\text{C}$. Blanda dem försiktigt och ställ dem på is före användning.
- 9.3 Ställ i ordning märkta 12 x 75 mm borosilikatglasrör för dubbelprov enligt Lathund för testet på baksidan av omslaget.
- 9.4 Ställ provrörsstället med rören på krossad is.

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$

9.5 Tillsätt reagens enligt följande:

- a. **Rör för total aktivitet**
Ställ undan dessa fram till steg 7
- b. **Ospecifik bindning (NSB)**
100 µL kalibreringslösning 0
- c. **kalibreringslösning 0**
100 µL kalibreringslösning 0
200 µL kalcitoninantiserum (blått)
- d. **Kalcitoninkalibreringslösningar**
100 µL kalcitoninkalibreringslösning
200 µL kalcitoninantiserum (blått)
- e. **Kvalitetskontroll och patientprover**
100 µL serum
200 µL kalcitoninantiserum (blått)

9.6. Vortexa rören försiktigt utan att det bildas skum och inkubera dem 16-24 timmar vid 2-8 °C.

9.7 Tillsätt 100 µL ¹²⁵I-kalcitonin (rött) till alla rör.

9.8 Vortexa rören försiktigt utan att det bildas skum och inkubera dem 16-24 timmar vid 2-8 °C.

9.9 Skaka utfällningskomplexet kraftigt; pipettera 500 µL till alla rör utom totalaktivitetsrören.

9.10 Vortexa rören försiktigt utan att det bildas skum och inkubera dem 15-20 minuter vid 20-25 °C.

9.11 Centrifugera rören 20 minuter vid 760 x g* och 20-25 °C.

9.12 Dekantera genast supernatanten från alla rör utom totalaktivitetsrören genom att vända dem upp och ner i högst 2 minuter. Håll rören mot absorberande papper för att få bort eventuella supernatandroppar från kanterna innan du vänder rören rätt igen.

9.13 Använd gammaraäknare och räkna fällningen i varje rör samt totalaktivitetsrören under tillräckligt lång tid för att statistiskt säkra resultat ska erhållas. (Se avsnittet Metodbegränsningar.).

10. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

10.1 Tillsätt alla reagens till den nedersta tredjedelen av provröret så att reagensen kan blandas fullständigt.

10.2 Assayrören måste göras i ordning på krossad is för att undvika falskt höga värden.

10.3 Engångs borosilikatglasrör rör från vissa tillverkare kan ge en förhöjd ospecifik bindning. Plaströr **får ej** användas i denna assay.

10.4 Om du väljer att suga bort supernatanten från fällningen måste du vara försiktig så att du inte rör upp fällningen.

10.5 För att bekräfta att ett RIA-test ger konsekventa resultat kan man kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man regelbundet kontrollerar följande parametrar för att vara säkra på att satsen ger konsekventa resultat:

- a. **Totalaktivitet**
- b. **Maximal bindning**
Medelvärde för aktiviteten (CPM) i rören för kalibreringslösning 0/CPM-medelvärde för totalaktivitetsrören.

$$* \quad g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

c. Ospecifik bindning

CPM-medelvärde för NSB-rören / CPM-medelvärde för totalaktivetsrören.

d. Kalibreringskurvans lutning

Följ exempelvis kalibreringskurvans punkter för 80, 50 och 20% hämning.

11. KVALITETSKONTROLL

Alla laboratorier skall ta med minst två kontroller vid varje assay för att garantera att resultaten blir korrekta. Man bör fastställa ett medelvärde och en standardavvikelse för varje kontroll genom att köra den i minst tio assayer. Man kan få fram ett godkänt område för kontrollerna genom att använda ± 2 standardavvikelser för de tidigare uppmätta värdena. DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium har bestämt ett intervall för de kvalitetskontrollsera som ingår i satsen.

12. RESULTATBERÄKNING

Det finns många olika metoder för att beräkna resultaten från RIA-test. Alla är baserade på att man tar fram en kalibreringskurva genom att plotta bindningsgraden mot de angivna koncentrationerna hos kalibreringslösningarna. Diagrammet kan ha antingen linjär eller logaritmisk skala. Samtliga metoder ger i stort sett samma värden för kontroller och prov, även om en viss beräkningsmetod kan "passa" bättre för vissa assayer än för andra. Den beräkningsmetod som används på DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium är % B/B₀ avsatt mot logaritmen för koncentrationen.

12.1 Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.

12.2 Subtrahera medel-CPM för NSB-rören från alla värden.

12.3 Dividera det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov med det korrigerade CPM-värdet för 0-lösningen.

$$B/B_0 \% = \frac{\text{CPM för kalibreringslösning eller okänt prov} - \text{CPM för NSB}}{\text{CPM för 0-kalibreringslösningen} - \text{CPM för NSB}} \times 100$$

12.4 Använd ett lin-log-papper över två tiopotenser eller log-log-papper och plotta procent B/B₀ för kalcitoninkalibreringslösningarna (lodrät axel) mot koncentrationen (vågrät axel).

12.5 Rita en optimalt anpassad linje genom punkterna.

12.6 Läs av kalcitoninhalten i de okända proverna från kurvan.

12.7 Om ett okänt prov ger ett högre värde än den högsta kalibreringslösningen, skall provet spädas på lämpligt sätt med kalibreringslösning 0 och därefter testas på nytt.

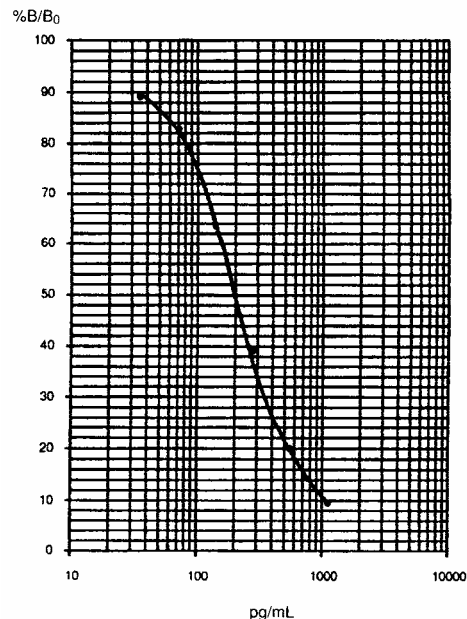
12.8 Om ett okänt prov har späts, korrigerar man för spädningsfaktorn.

12.9 Beräkna maximal bindning genom att dividera CPM för 0-lösningen med medelvärde för totalaktivetsrören.

TABELL II Exempeldata för DiaSorin Calcitonin II RIA					
Rör	CPM i dubbelprov	Medel- CPM	Korrigerad CPM	bundet (B/T)	Procent Konc. (B/B ₀)(pg/mL)
Total aktivitet	17 943 18 128	18 036			
NSB	878 824	851		4,7	
Kalibreringslösning 0	8 055 8 049	8 052	7 201	39,9	100,0
Kalibreringslösning (pg/mL)					
A (35,0)	7 344 7 211	7 278	6 427		89,3
B (70,0)	6 969 6 649	6 809	5 958		82,8
C (140)	5 390 5 476	5 433	4 582		63,7
D (280)	3 628 3 725	3 676	2 826		39,3
E (560)	2 301 2 286	2 293	1 442		20,0
F (1 120)	1 519 1 546	1 532	682		9,5
Okända prover					
1	6 087 5 940	6 014	5 162		71,7 115
2	4 796 5 012	4 904	4 053		56,3 163

Typiska provdata och en kalibreringskurva visas i TABELL II och FIGUR 1. Denna information är endast avsedd som ett exempel och skall inte användas för att beräkna några värden.

Exempel på kalibreringskurva för Calcitonin II



FIGUR 1

13. METODBEGRÄNSNINGAR

- 13.1** Om den ursprungliga halten i ett okänt prov är högre än den högsta kalibreringslösningen, skall man späda provet med enbart kalibreringslösning 0.
- 13.2** Aktiviteten i rören måste räknas under tillräckligt lång tid för att man ska kunna undvika statistiska fel (till exempel ger en räkning av 2 000 CPM ett fel på 5 %; 10 000 CPM ger ett fel på 1 %).
- 13.3** DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium använder en mjuk anpassning till spline-funktioner.

14. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Referensområde

Varje laboratorium bör upprätta ett eget referensområde. De normalvärden som observerades på DiaSorins laboratorium låg på 47 (± 24 pg/mL), vilket skulle innebära ett referensområde (2 std-avv.) inom icke detekterbart (ND)-95. Rökning kan ge lätt förhöjda serumkalcitoninnivåer.

15. SPECIFIKA PRESTANDA

15.1 Precision

Medelvariation inom serier

	Medelvärde (pg/mL)	S.D	%C.V.
LÅG	67,3	10,1	14,8
MEDEL	278,5	18,9	6,7
HÖG	530	30,7	5,7

Variation mellan serier

	Medelvärde (pg/mL)	S.D	%C.V.
LÅG	92,76	13,42	14,47
MEDEL	142,55	16,55	11,61
HÖG	528,79	36,7	6,95

15.2 RIKTIGHET: RIKTIGHETEN FÖR ASSAYEN HAR KONTROLLERATS MED ETT LINEARITETSTEST OCH ETT UTBYTESTEST.

Linearitet (parallellitet)

Seriespänningsstudie av fyra okända prover

Prov nummer	Outspätt (pg/mL)	1/2	1/4	1/8
1	534	624,5	663,7	696,1
2	277,2	291,8	346,5	289,4
3	975,6	1216,9	1396,8	1487,6
4	819,3	1047,9	1144,2	1081

Utbyte

Fem okända prover späddes 1:1 med kalibreringslösningar på 0, 48, 96, 193, 385, 770 och 1 540 pg/mL. Varje spädning testades sedan och det totala medelutbytet i % beräknades för varje okänt prov.

Prov nummer	Totalt medelutbyte (%)
1	105
2	83
3	77
4	85
5	85

15.3 Analytisk känslighet

Den lägsta detekterbara halten ligger på 1,5 pg/rör (15 pg/ml) när den definieras som den skenbara halten vid tre standardavvikelser från aktiviteten för maximal bindning.

15.4 Analytisk specificitet

Jämförelse av kalcitoninantikroppens korsreaktivitet utfördes med följande peptider:

Peptid	% korsreaktivitet
Parathormon	< 0,01
Insulin	< 0,01
Tyreoidastimulerande hormon	< 0,01
Adrenokortikotropt hormon	< 0,01
Prolaktin	< 0,01

Laxkalcitonin korsreagerar ej med antiserumet. Råttkalcitonin ger en korsreaktion och assayen kan därför användas för studier på råttor.

15.5 Interferens

Interferensstudier utfördes med NCCLS EP7-A som riktlinje för att fastställa effekterna av vanliga endogena interfererande substanser. Resultaten visade på en interferens vid tillsats av triglycerider och hemoglobin. Tillsats av kolesterol och bilirubin påverkade ej resultaten.

SE SISTA SIDAN FÖR REFERENSER

LATHUND FÖR TESTET

1. Rekonstituera de frystorkade reagensen och låt eventuella frysta prover tina helt. Se till att reagensen ej blir varmare än 25°C. Blanda försiktigt och ställ reagensen på is tills de ska användas.
2. Märk upp rör för dubbelprover. Ställ provrörsstället med rören på krossad is.
3. Pipettera reagens enligt följande schema:

Rör/Reagens	Totala ktivitet	NSB	CAL 0-5	Kontroller och okända prover
Kalibreringslösning 0	-	100 µL	100 µL	-
Kalibreringslösningar (1-6)	-	-	100 µL	-
Extraherade kontroller	-	-	-	100 µL
Extraherade okända prover	-	-	-	100 µL
Antiserum	-	-	200 µL	200 µL

4. Täck över rören med parafilm och vortexa försiktigt.
5. Inkubera 16-24 timmar vid 2-8 °C.
6. Tillsätt 100 µL spårämne till varje rör.
7. Sätt på parafilm och vortexa försiktigt.
8. Inkubera 16-24 timmar vid 2-8 °C.
9. Tillsätt 500 µL utfällningskomplex i varje rör, utom i totalaktivetsrören.
10. Inkubera 15-25 minuter vid 20-25 °C.
11. Centrifugera 20 minuter vid 760 x g*.
12. Häll av supernatanterna.
13. Räkna varje rör i en gammräknare i minst 60 sekunder.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

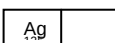
REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFI

A

1. Abe, Kaoru, I. Adachi, S. Miyakawa, M. Tanaka, K. Yamaguchi, N. Tanaka, T. Kameya and Y. Shimosato, "Production of Calcitonin, Adrenocorticotrophic Hormone and β -Melanocyte-stimulating Hormone in Tumors Derived from Amine Precursor Uptake and Decarboxylation Cells," **Cancer Research**, 37:4190, (1977).
2. Baylin, S.B., W.R. Weisberger, J.C. Eggleston, G. Mendelsohn, M.A. Beaven, M.D. Abeloff and D.S. Ettinger, "Variable Content of Histaminase, L-Dopa Decarboxylase and Calcitonin in Small-Cell Carcinoma of the Lung," **The New England Journal of Medicine**, 299(3):105, (1978).
3. Bertagna, X.Y., W.E. Nicholson, O.S. Pettengill, D.G. Sorenson, C.D. Mount and D.M. Orth, "Ectopic Production of High Molecular Weight Calcitonin and Corticotropin by Human Small Cell Carcinoma Cells in Tissue Culture: Evidence for Separate Precursors," **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 47(6):1390, (1978).
4. Coombes, R.D., G.C. Easty, S.I. Detre, C.J. Hillyard, U. Stevens, S.I. Girgis, L.S. Galante, L. Heywood, I. MacIntyre and A.M. Neville, "Secretion of Immunoreactive Calcitonin by Human Breast Carcinomas," **British Medical Journal**, 4:197, (1975).
5. Corwin, T.R., "Medullary Carcinoma of the Thyroid," **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, 138:453, (1974).
6. Deftos, L.B., B. Roos and J. Parthemore, "Calcium and Skeletal Metabolism," **Western Journal of Medicine**, 123:447, (1975).
7. Goltzman, D., J.T. Potts, Jr., E.C. Ridgeway and F. Maloof, "Calcitonin as a Tumor Marker – Use of the Radioimmunoassay for Calcitonin in the Post-operative Evaluation of Patients with Medullary Thyroid Carcinoma," **The New England Journal of Medicine**, 290(19):1035, (1974).
8. Gropp, C., K. Havemann and A. Scheuer, "Ectopic Hormones in Lung Cancer Patients at Diagnosis and During Therapy," **Cancer**, 46:347, (1980).
9. Hansen, M., H.H. Hansen and N. Tryding, "Small Cell Carcinoma of the Lung: Serum Calcitonin and Serum Histaminase (Diamine Oxidase) at Basal Levels and Stimulated by Pentagastrin," **Acta Medica Scandinavica**, 204:257, (1978).
10. Heath, III, J. and G.W. Sizemore, "Plasma Calcitonin in Normal Man – Differences Between Men and Women," **The Journal of Clinical Investigation**, 50:1135, (1977).
11. Hennessy, J.F., T.K. Gray, C.W. Cooper and D.A. Ontjes, "Stimulation of Thyro-calcitonin Secretion by Pentagastrin and Calcium in Two Patients with Medullary Carcinoma of the Thyroid," **The Journal of Clinical Endocrinology**, 7:45, (1977).
12. Hill, Jr., C.S., "Medullary Carcinoma of the Thyroid," **American Federation Proceedings**, 99, (1973).
13. Hillyard, C.J., D.G. Oscier, R. Foa, D. Catovsky and J.M. Goldman, "Immunoreactive Calcitonin in Leukaemia," **British Medical Journal**, 2:1392, (1979).
14. Parthemore, J.G. and L.J. Deftos, "Calcitonin Secretion in Normal Human Subjects," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 47(1):184, (1978).
15. Rees, L.H., "Ectopic Hormone Production by Cancer Cells," **Lab-Lore** 8, (1978).
16. Richardson, R.L., F.A. Greco, R.K. Oldham and G.W. Liddle, "Tumor Products and Potential Markers in Small Cell Lung Cancer," **Seminars in Oncology**, 5:253, (1978).
17. Roof, B.S., R. Weinstein, I., Vuji, N.M. Burdash and M. Dopson, "Immunoheterogeneity of the Calcitonins of Hypercalcemia, Breast and Lung Cancer and Medullary Carcinoma of Thyroid," **Abstract 797**, Endocrine Society Meeting No. 60, Miami, Florida, (1978).

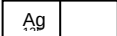
18. Roos, B.A., "Calcitonin as Tumor Marker," **RIA for Physicians** 5, (1980).
19. Roos, B.A., A.W. Lindall, S.B. Baylin, J. O'Neil, A.L. Frelinger, R.S. Birnbaum and P.W. Lambert, "Plasma Immunoreactive Calcitonin in Lung Cancer," **Endocrine Research Communications**, 6(2):169, (1979).
20. Roos, B.A., A.W. Lindall, S.B. Baylin, J. O'Neil, A.L. Frelinger, R.S. Birnbaum and P.W. Lambert, "Plasma Immunoreactive Calcitonin in Lung Cancer," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 50:659, (1980).
21. Samaan, J.A., M. Ibanez and C.S. Hill, Jr., "Medullary Carcinoma of the Thyroid and Astrocytoma," **Annals of Internal Medicine**, 86(5):585, (1977).
22. Schwartz, K.E., A.R. Wolfson, B. Forster and W.D. Odell, "Calcitonin in Nonthyroidal Cancer," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 49:438, (1979).
23. Schwartz, K.E., A.R. Wolfson and W.D. Odell, "Plasma Calcitonin – Use as a Tumor Marker," **Abstract 572**, Endocrine Society Meeting No. 60, Miami, Florida, (1978).
24. Silva, O.L. and K.L. Becker, "High Plasma Calcitonin Levels in Breast Cancer," **British Medical Journal**, 21:460, (1976).
25. Silva, O.L., L.E. Broder, J.L. Doppman, R.H. Snider, C.F. Moore, M.H. Cohen and K.L. Becker, "Calcitonin as a Marker for Bronchogenic Cancer," **Cancer**, 44:680, (1979).
26. Silva, O.L., K.L. Becker, A. Primack, J.L. Doppman and R.H. Snider, "Hypercalcitemia in Bronchogenic Cancer—Evidence for Thyroid Origin of the Hormone," **Journal of the American Medical Association**, 234(2):183, (1975).
27. Silva, O.L., K.L. Becker, A. Primack, J.L. Doppman and R.H. Snider, "Increased Serum Calcitonin Levels in Bronchogenic Cancer," **Chest**, 69(4):495, (1976).
28. Tashjian, A.H. Jr., B.G. Howland, K.E.W. Melvin and C.S. Hill, Jr., "Immunoassay of Human Calcitonin—Clinical Measurement, Relation to Serum Calcium and Studies in Patients with Medullary Carcinoma," **The New England Journal of Medicine**, 283 (17):890, (1978).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisero	Antisiero
	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
	Tracer: antigen labelled with ¹²⁵ I	Traceur : antigène marqué à l'iode ¹²⁵	Tracer: ¹²⁵ I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ¹²⁵ I	Tracciatore: antigene etichettato con ¹²⁵ I
	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

Continued from previous page - Symbols used with devices

	Swedish
	Europeisk överensstämmelse
	Utgångsdatum
	Tilverkare
	Se bruksanvisningen
	Diagnostik in vitro.
	Batch-nummer
	Temperaturbegränsning.
	Antiserum
	Utfällningsreagens
	Spårelement: antigen betecknad med ¹²⁵ I
	Kalibrator
	Kontrollserum
	Radioaktiv
	Skadligt

Distribué Par :

DiaSorin S.A.
11, rue Georges Besse
92160 Antony, France



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

10399

27305
9/03

PRINTED IN U.S.A.

